



Facultad de Veterinaria

Trabajo de
Fin de Grado

Reevaluación de la toxicidad *in vitro* de los azaspirácidos y de sus efectos sobre la morfología celular.

Reevaluación da toxicidade *in vitro* dos azaspirácidos e dos seus efectos na morfoloxía celular.

Reevaluation of the *in vitro* toxicity of azaspiracids and their effects on cell morphology.

Sandra Raposo García

Grado en Veterinaria

Año 2020

Modalidad del Trabajo: Experimental

Licencia

Esta obra pertenece a Sandra Raposo García y está sujeta a una licencia de “Reconocimiento-Compartir Igual 4.0 Internacional de Creative Commons”. Para ver una copia de esta licencia visite <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>.



Resumen, Resumo, Abstract

RESUMEN

Los azaspirácidos son ficotoxinas marinas producidas por dinoflagelados del fitoplancton pertenecientes principalmente a los géneros *Azadinium* y *Amphidoma*. Este grupo de toxinas marinas, identificado por primera vez a finales del pasado siglo, comprende en la actualidad más de 60 análogos químicos, que pueden acumularse en la cadena trófica produciendo intoxicaciones alimentarias en humanos. Actualmente, el mecanismo de acción de estas toxinas se desconoce por completo, si bien múltiples estudios llevados a cabo durante los últimos años, han demostrado que estas toxinas producían efectos citotóxicos *in vitro* y provocaban cambios en la morfología celular, afectando principalmente al citoesqueleto de actina.

En este trabajo se han estudiado los efectos *in vitro* de dos de los principales análogos de los azaspirácidos, cuyos límites en productos pesqueros están regulados en la legislación europea vigente, empleando dos modelos de líneas celulares humanas (células embrionarias de riñón y células de neuroblastoma). Los resultados obtenidos en este trabajo, empleando dos ensayos de citotoxicidad diferentes, sugieren que los principales efectos celulares de los azaspirácidos están relacionados con alteraciones en la adhesión celular y en la actividad metabólica, así como con modificaciones en la estructura del citoesqueleto celular. No obstante, se necesitan estudios adicionales para dilucidar completamente el mecanismo de acción de este amplio grupo de toxinas marinas.

PALABRAS CLAVE: Ficotoxinas marinas, azaspirácidos, citotoxicidad, citoesqueleto, actina, seguridad alimentaria.

RESUMO

Os azaspirácidos son ficotoxinas mariñas producidas por dinoflagelados do fitoplancto pertencentes principalmente aos xéneros *Azadinium* e *Amphidoma*. Este grupo de toxinas mariñas, identificado por primeira vez a finais do século pasado, actualmente comprende máis de 60 análogos químicos, que poden acumularse na cadea trófica producindo intoxicacións alimentarias en humanos. Actualmente, o mecanismo de acción destas toxinas descoñécese por completo, aínda que, múltiples estudos realizados nos últimos anos, demostraron que estas toxinas producían efectos citotóxicos *in vitro* e provocaban cambios na morfoloxía celular, afectando principalmente ao citoesqueleto de actina.

Neste traballo estudáronse os efectos *in vitro* de dous dos principais análogos dos azaspirácidos, con límites nos produtos da pesca regulados na lexislación europea vixente, utilizando dous modelos de liñas celulares humanas (células embrionarias de ril e células de neuroblastoma). Os resultados obtidos neste traballo, empregando dous ensaios de citotoxicidade diferentes, suxiren que os principais efectos celulares dos azaspirácidos están relacionados con alteracións na adhesión celular e na actividade metabólica, así como con modificacións na estrutura do citoesqueleto celular. Non obstante, son necesarios estudos adicionais para dilucidar completamente o mecanismo de acción deste amplo grupo de toxinas mariñas.

PALABRAS CHAVE: Ficotoxinas mariñas, azaspirácidos, citotoxicidade, citoesqueleto, actina, seguridade alimentaria.

ABSTRACT

Azaspiracids are marine phycotoxins produced by phytoplankton dinoflagellates belonging mainly to the *Azadinium* and *Amphidoma* genera. This group of marine toxins, first identified at the end of the last century, currently comprises more than 60 chemical analogues, which can accumulate in the trophic chain, causing human food intoxications. Currently, the mechanism of action of these toxins is completely unknown, although multiple studies performed in recent years, have shown that these toxins produced cytotoxic effects *in vitro* and caused changes in cell morphology, mainly affecting the actin cytoskeleton.

In this work we have studied the *in vitro* effects of two of the main analogues of azaspiracids, whose limits in fishery products are regulated in the current European legislation, using two models of human cell lines (kidney embryonic cells and neuroblastoma cells). The results presented in this work, using two different cytotoxicity assays, suggests that the main effects of azaspiracids are related to alterations in cell adhesion and metabolic activity, as well as with modifications in the structure of the actin cytoskeleton. However, additional studies are needed to fully elucidate the mechanism of action of this broad group of marine toxins.

KEY WORDS: Marine phycotoxin, azaspiracids, cytotoxicity, cytoskeleton, actin, food safety.

Índice

Índice	5
Índice de figuras	6
Índice de tablas	6
Abreviaturas	7
Introducción.....	9
Toxinas marinas y cambio climático.....	9
Azaspirácidos	12
Canales de sodio dependientes de voltaje	16
Citoesqueleto de actina.....	17
Objetivos	19
Material y métodos.....	20
Toxinas y reactivos utilizados	20
Líneas celulares empleadas	20
Cultivo de células HEK293.....	20
Cultivo de células de neuroblastoma humano	21
Ensayos de valoración de la citotoxicidad <i>in vitro</i> de los azaspirácidos	21
MTT	21
ALAMAR BLUE	22
Cultivo celular	23
Tratamiento de las células con azaspirácidos y determinación de la viabilidad celular.....	25
Tinción de la membrana celular	25
Inmunocitoquímica y análisis microscópico	26
Análisis estadístico.....	28
Resultados	29
Efecto de los azaspirácidos sobre la viabilidad celular empleando el ensayo del MTT	29
Efecto de los azaspirácidos sobre la viabilidad celular empleando el ensayo del alamar blue	32
Efecto de los azaspirácidos sobre la morfología celular	33
Efecto de los azaspirácidos sobre la estructura de la membrana celular	34
Efecto de los azaspirácidos sobre el citoesqueleto celular	35
Discusión	38
Conclusiones	41
Bibliografía	42

Índice de figuras

Figura 1. Estructura química del azaspirácido 1	12
Figura 2. Estructura química del azaspirácido 2	12
Figura 3. Comparación de la estructura química de los azaspirácidos 1, 2 y 3	13
Figura 4. Imágenes de microscopía óptica y electrónica de <i>Azadinium spinosum</i>	14
Figura 5. Distribución mundial de los dinoflagelados del género <i>Azadinium</i>	15
Figura 6. Estructura de la subunidad alfa de un canal de sodio dependiente de voltaje.....	16
Figura 7. Disposición de las principales proteínas del citoesqueleto	17
Figura 8. Esquema de la interacción de la actina con canales iónicos	18
Figura 9. Estructura química del MTT y el formazán	22
Figura 10. Estructura química de la resazurina y resorufina	23
Figura 11. Aspecto microscópico de los cultivos celulares	24
Figura 12. Espectro de excitación y emisión del marcador de la membrana celular	26
Figura 13. Espectro de excitación y emisión de Hoechst y Cy3	27
Figura 14. Espectro de excitación y emisión de Hoechst y Alexa Fluor 488	28
Figura 15. Efecto de AZA-1 y AZA-2 sobre la viabilidad celular de neuroblastoma (MTT) ...	29
Figura 16. Efecto del AZA-1 sobre la viabilidad de células HEK293 (MTT)	30
Figura 17. Efecto del AZA-1 sobre la viabilidad de células HEK293 (MTT sin lavar)	31
Figura 18. Efecto de la tetrodotoxina sobre la citotoxicidad del AZA-1 (MTT)	31
Figura 19. Efecto de AZA-1 sobre la viabilidad de células HEK293 (Alamar Blue)	33
Figura 20. Efecto del AZA-1 sobre la membrana celular	34
Figura 21. Efecto del AZA-1 sobre el citoesqueleto (37 °C)	36
Figura 22. Efecto del AZA-1 sobre el citoesqueleto (30 °C)	37

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación de las toxinas marinas y sus dianas farmacológicas	11
---	----

Abreviaturas

AD	Ácido domoico
ADN	Ácido desoxiribonucleico
AO	Ácido Ocadaico
ASP	Toxinas amnésicas
ATCC	American Type Culture Collection
AZA	Azaspirácido
AZP	Intoxicación por azaspirácidos
BSA	Albúmina de suero bovino (bovine serum albumin)
BTX	Brevetoxina
B.w.	Peso corporal (body weight)
CFP	Intoxicación por ciaguatera
CI	Iminas cíclicas
DL ₅₀	Dosis letal 50
DMEM/F12	Medio de cultivo (Dulbecco's modified Eagles medium)
DMEN-NEAA	Aminoácidos no esenciales (Non essential aminoacids)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPBS	Tampón fosfato salino (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline)
DRA	Dosis aguda de referencia
DSP	Intoxicación por toxinas diarreicas
DTX	Dinofisistoxinas
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EFSA Safety Authority)	Agencia Europea de seguridad alimentaria (European Food Safety Authority)
Eq	Equivalentes
FBS	Suero fetal bovino (fetal bovine serum)
HAB	Floración algal nociva (Harmful algal bloom)
HEK293	Células embrionarias de riñón humano
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanosulfónico
IC	Intervalo de confianza
IC ₅₀	Concentración inhibitoria 50
LC-MS/MS	Cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas (Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry)
MTT	Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-ilo]-2,5-difeniltetrazol

Na-K-ATPasa	Bomba de sodio-potasio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NSP	Toxinas neurotóxicas no PSP
NTX	Toxinas neurotóxicas
PBS	Tampón fosfato salino (Phosphate buffered saline)
PPDE	Fosfodiesterasas
PSP	Toxinas paralizantes
PLTX	Palitoxina
PTX	Pectenotoxina
Rpm	Revoluciones por minuto
Rs	Receptores
SEM	Error estándar de la media
SDS	Dodecilsulfato sódico
SPX	Espirólidos
STX	Saxitoxina
TEF	Factores de equivalencia tóxica (Toxic equivalency factors)
TTX	Tetrodotoxina
UI	Unidades internacionales
VGSC	Canales de sodio dependientes de voltaje
YTX	Yesotoxina

Introducción

Toxinas marinas y cambio climático

Los océanos cubren el 70% de la superficie terrestre y albergan el 90% de la biosfera. Todos los océanos del mundo están experimentando un grave estrés ambiental y ecológico debido al cambio climático (McKibben et al., 2017; Trainer et al., 2020). Las capas de agua más cercanas a la superficie del océano sufren más rápida e intensamente que las aguas profundas, las variaciones de las condiciones atmosféricas como el calentamiento. El fitoplancton, que comprende organismos acuáticos con capacidad fotosintética, se encuentra en las aguas superficiales de los océanos. Por consiguiente, los componentes del fitoplancton serán los primeros en responder a los cambios que se produzcan en las condiciones climáticas (Trainer et al., 2020).

El aumento de la temperatura, parámetro clave en el cambio climático, afecta directa e indirectamente al fitoplancton puesto que influye en los procesos fisiológicos de división de las algas, aumentando las tasas de crecimiento de estos microorganismos hasta alcanzar millones de células por litro al día (Botana and Vilariño, 2018), así como la fotosíntesis, la motilidad, las tasas de asimilación de nutrientes y llega a producir una redistribución geográfica de las floraciones de algas marinas (Trainer et al., 2020).

Las floraciones de algas marinas se producen de forma natural en los ecosistemas, siguiendo ciclos dinámicos, pero estos ciclos se han visto modificados durante las últimas décadas. Un riesgo evidente para la seguridad alimentaria deriva del calentamiento global que ha provocado un aumento en la frecuencia, intensidad y expansión geográfica de todos los microorganismos que componen el fitoplancton, principalmente de algas perjudiciales y por consiguiente de los compuestos tóxicos que éstas producen (Trainer et al., 2020). De las más de 5000 especies de algas conocidas existen unas 300 especies que proliferan en cantidades tan elevadas que alteran el color de la superficie oceánica dando lugar a las denominadas mareas rojas (Van Egmond et al., 2005). Estos cambios se potencian además de por el incremento en la temperatura de los océanos por otros factores relacionados que comprenden alteraciones en las condiciones del agua tales como la salinidad, transparencia etc (Botana, 2016; McKibben et al., 2017; Botana and Vilariño, 2018).

Muchas de las floraciones algales de las que se producen en la naturaleza son beneficiosas para los ecosistemas, sin embargo, existen otras que les afectan negativamente puesto que se producen compuestos extremadamente tóxicos que se acumulan en peces y moluscos filtradores perjudicando así la pesca, el turismo y la salud de los consumidores

(Farabegoli et al., 2018; Bechard, 2019). Esto ocurre cuando proliferan especies de fitoplancton tóxico que recibe el nombre de floraciones algales nocivas (HAB, del inglés harmful algal blooms) o mareas rojas. Las especies de fitoplancton implicadas principalmente en estas floraciones tóxicas son dinoflagelados o diatomeas (Farabegoli et al., 2018). Las toxinas producidas por estas especies, denominadas ficotoxinas, son muy potentes, pudiendo acumularse en la cadena alimentaria y provocar la muerte de peces, aves y mamíferos marinos (Fauquier et al., 2013; Lefebvre et al., 2016). Tal como se ha mencionado anteriormente, estas toxinas pueden acumularse en peces y moluscos que se alimentan por filtración, tales como mejillones, ostras o almejas, y por consiguiente la proliferación de estas algas nocivas representa un riesgo emergente para la salud humana ya que durante los últimos años, además de las toxinas habituales en las costas europeas se ha descrito la aparición, en estas latitudes, de toxinas típicas de aguas más cálidas (Pistocchi et al., 2012; Biessy et al., 2019). Por este motivo, en la legislación europea vigente existen límites de los niveles máximos de estos compuestos en productos pesqueros permitidos para las toxinas habituales en nuestras costas, así como también figuran los métodos de detección oficiales para cada una de ellas (Botana, 2016; Botana et al., 2016).

En la actualidad aún se desconoce la función de las toxinas marinas en el desarrollo de los organismos productores, pero sí se sabe que producen efectos muy específicos, y algunas muy letales en el reino animal (Botana, 2016; Botana and Vilariño, 2018). Se cree que estos compuestos son utilizados probablemente por los organismos productores como una forma de defensa contra un crecimiento desmesurado de otros organismos o bien para combatir la predación o para luchar por los espacios (Botana, 1996). Una de las características más relevantes de las ficotoxinas marinas es su complejidad química, ya que muchos de estos compuestos poseen varios enlaces poliéter y la síntesis química de las mismas es difícil, o prácticamente inaccesible para la química actual (Botana and Vilariño, 2018).

A pesar de que hoy en día aún no existe un criterio unánime para la clasificación de estos compuestos, lo más habitual es que se clasifiquen según su estructura química o bien según la sintomatología que causan en humanos (Botana et al., 2016). En función de su estructura química, las ficotoxinas marinas, se pueden clasificar en varios grupos diferentes que se indican en la Tabla 1. En función de los síntomas que produce la intoxicación por estas toxinas en humanos, se clasifican como toxinas paralizantes (PSP), toxinas amnésicas (ASP), toxinas diarreicas (DSP), toxinas neurotóxicas no PSP (NSP), intoxicación por ciguatera (CFP) e intoxicación por azaspirácidos (Botana et al., 2016). A continuación se resumen con los diferentes grupos de toxinas marinas, las toxinas representantes de cada grupo y la principal diana celular descrita hasta el momento, así como los límites legales establecidos en Europa (Estevez et al., 2019).

<i>Grupo</i>	<i>Representante</i>	<i>Diana celular</i>	<i>Límites en Europa</i>	<i>Productos pesqueros afectados</i>
Toxinas diarreicas (DSP)	Ácido Ocadaico (AO), dinofisistoxinas (DTX) y pectenotoxinas (PTX)	OA y DTX: Inhiben fosfatasas PTX: Inhibe polimerización actina	160 µg-Eq/kg	Mariscos
Toxinas paralizantes (PSP)	Saxitoxina (STX)	Bloqueo VGSC (sitio 1)	800 µg-Eq/kg	Mariscos
Azaspirácidos (AZAs)	Azaspirácido 1-3 (AZA 1-3)	Desconocida	160 µg-Eq/kg	Mariscos
Yesotoxinas (YTXs)	Yesotoxina (YTX)	Activa PPDEs + otros	3.75 mg- Eq/kg	Mariscos
Palitoxinas (PLTX)	Palitoxina (PLTX)	Na-K-ATPasa	No regulada	Mariscos
Toxinas amnésicas (ASP)	Ácido Domoico (AD)	Rs. Kainato	20 mg/kg	Mariscos y peces
Toxinas ciguatera (CTX)	Ciguatoxina 1 (CTX)	Activa VGSC (sitio 5)	No regulados (los productos con CTX no se comercializan).	Peces
Toxinas neurotóxicas (NTX)	Brevetoxinas A, B (BTX)	Activa VGSC (sitio 5)	No reguladas	Mariscos
Iminas cíclicas (CI)	Gimnodimina, espirólidos (SPX)	Bloqueo receptores nicotínicos	No reguladas	Mariscos
Tetrodotoxinas (TTX)	Tetrodotoxina (TTX)	Bloqueo VGSC	No reguladas. (los productos con TTX no se comercializan). Nivel máximo propuesto 44 µg/kg.	Mariscos y peces

Tabla 1: Resumen de los diferentes grupos de toxinas marinas, sus dianas farmacológicas y de sus límites en productos pesqueros. VGSC: canales de sodio dependientes de voltaje; PPDE: Fosfodiesterasas; Rs: receptores; Na-K-ATPasa: Bomba de sodio-potasio; Eq: equivalentes. Adaptado de (Estevez et al., 2019).

Las ficotoxinas marinas empleadas en este trabajo experimental han sido los azaspirácidos, en concreto, dos de los análogos más frecuentes y disponibles comercialmente como material certificado de referencia (azaspirácido 1 (AZA-1) y azaspirácido 2 (AZA-2)). La estructura química de estos compuestos se muestra en las figuras 1 y 2, respectivamente.

Azaspirácido 1. Fórmula química $C_{47}H_{71}NO_{12}$. Peso molecular $842.077 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

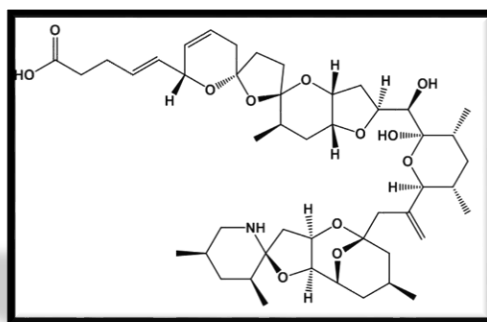


Figura 1. Estructura química del azaspirácido 1.

Azaspirácido 2. Fórmula química $C_{48}H_{73}NO_{12}$. Peso molecular $856.093 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

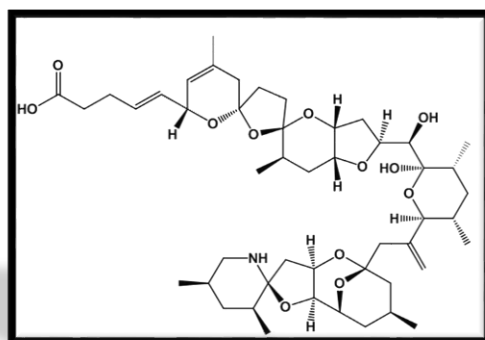


Figura 2. Estructura química del azaspirácido 2.

Azaspirácidos

Los azaspirácidos (AZAs) son toxinas marinas descubiertas en 1996, después de que en 1995 causasen intoxicaciones alimentarias a 8 personas en Holanda, debido al consumo de mejillones procedentes de Irlanda (Ofuji et al., 1999). La sintomatología que presentaron las personas afectadas fue principalmente digestiva, similar a la que se producía en las intoxicaciones diarreicas por consumo de mariscos (DSP), sin embargo, el contenido en toxinas DSP era muy bajo (Ofuji et al., 1999). Esto llevó a realizar estudios más exhaustivos en los cuales se realizaron bioensayos con ratones, y se observó que, además, se producía sintomatología neurotóxica, la cual difería mucho de los síntomas producidos tras intoxicaciones con toxinas diarreicas. Se identificó así la estructura de los azaspirácidos y el nuevo síndrome tóxico pasó a denominarse intoxicación por azaspirácidos (Vilarino et al., 2006; Vale et al., 2007; Pelin et al., 2019).

Los azaspirácidos comprenden un grupo de toxinas caracterizadas por una estructura química particular, con un grupo azaspiro con un anillo 2,9-dioxobiciclononano, un residuo trioxodispirocetal unido a un anillo tetrahidrofurano y un ácido carboxílico. Actualmente se han descrito más de 60 análogos pertenecientes a este grupo, incluyendo tanto los análogos naturales

como los compuestos derivados de la biotransformación de estos (Kilcoyne et al., 2014). En humanos los síntomas que ocasionan son principalmente gastrointestinales y comprenden vómitos, náuseas, diarrea y calambres abdominales, que se inician unas horas después de la ingestión y duran hasta 30 horas, con recuperación después de 2–3 días (Vilarino, 2008).

Actualmente, la legislación (REGLAMENTO (CE) 853/2004), establece unos niveles máximos permitidos de azaspirácidos de 160 µg equivalente de azaspirácido por kg de vianda (Unión Europea, 2004). Los datos relativos a la toxicidad *in vivo* e *in vitro* de estas toxinas marinas han permitido que la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, del inglés European Food Safety Authority) estableciese una dosis aguda de referencia (DRA) de 0.2 µg de AZA equivalentes/kg de peso corporal (b.w., del inglés body weight) es decir, para un adulto de 60 kg una porción de 400 g de mariscos no debe contener más de 12 µg de toxina (EFSA, 2008). Se ha descrito que las concentraciones máximas de azaspirácidos en moluscos generalmente se alcanzan a fines del verano o principios del otoño (Dhanji-Rapkova et al., 2019). Es importante tener en cuenta también que los azaspirácidos no se destruyen a las temperaturas de cocinado a las que se someten los mariscos que las contienen, por lo tanto, seguirían presentes a pesar del tratamiento térmico, puesto que este es insuficiente (EFSA, 2009). En la actualidad, la legislación (REGLAMENTO (CE) 15/2011) establece como método de análisis reconocido para determinar la concentración de azaspirácidos en moluscos bivalvos vivos el método analítico de cromatografía líquida asociado a espectrometría de masas (LC-MS/MS, del inglés Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry) (Unión Europea, 2011). Actualmente solo se monitorizan las concentraciones de los análogos AZA-1, AZA-2 y AZA-3. La estructura de estos 3 compuestos es muy similar tal como se muestra en la figura 3, que resume la estructura química de los análogos de los azaspirácidos producidos por el dinoflagelado *Azadinium spinosum* (FDA, 2012).

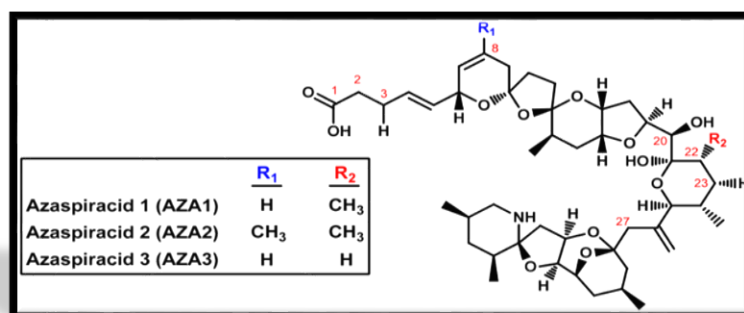


Figura 3. Comparación de la estructura química de los azaspirácidos 1, 2 y 3. Imagen obtenida de (FDA, 2012).

El origen de los azaspirácidos fue desconocido durante años. A partir del año 2003, se especuló que el dinoflagelado heterotrófico *Protoperdinium crassipes* podría ser el principal productor de estas toxinas. Y no fue hasta el año 2009 cuando los científicos del Instituto Alfred

Wegener (Alemania) demostraron que *P.crassipes* era simplemente una especie vector y no producía la toxina (Tillmann, 2009). Más adelante, se identificaron como géneros de fitoplancton productor de AZAs a *Azadinium* y *Amphidoma*, en concreto *Azadinium spinosum*, *Azadinium poporum*, *Azadinium dexteroporum* y *Amphidoma languida*. Sin embargo, la principal especie productora de azaspirácidos es *Azadinium spinosum* (Tillmann, 2009; Percopo et al., 2013; Kilcoyne et al., 2014; Kim et al., 2017; Rossi et al., 2017; Dhanji-Rapkova et al., 2019; Krock et al., 2019). *Azadinium spinosum* es un pequeño dinoflagelado fotosintético (12.3–15.7 μm de largo, 7.4–10.3 μm de ancho, con una relación media longitud/ancho de 1.6 μm), de forma elíptica y comprimida dorsoventralmente cuya imagen a microscopía óptica y a microscopía electrónica de barrido se muestra en la figura 4 (Tillmann, 2009).

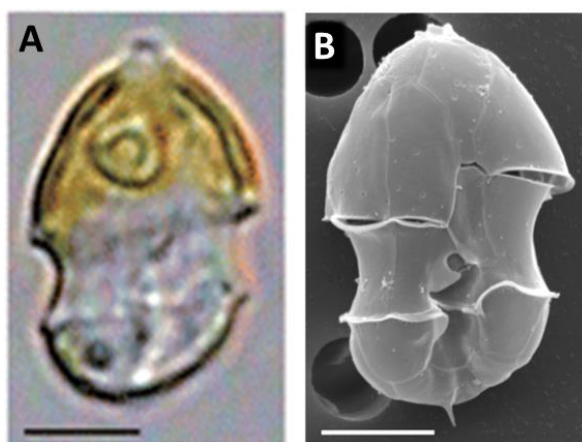


Figura 4. Imágenes de microscopía óptica (A) y de microscopía electrónica de barrido (B) de *Azadinium spinosum*. Escala: 5 μm . Imágenes adaptadas de (Tillmann, 2009).

Los últimos estudios han demostrado que no todos los análogos de los azaspirácidos son producidos por estas microalgas, sino que muchos de ellos se producen mediante reacciones de biotransformación en los mariscos vivos, o bien como subproductos formados durante el almacenamiento o cocción de mariscos contaminados con AZAs (Satake et al., 1998; Rehmann et al., 2008; McCarron et al., 2009; Jauffrais et al., 2012; Krock et al., 2012; Jauffrais et al., 2013).

Los dinoflagelados pertenecientes al género *Azadinium*, se encuentran distribuidos por todo el mundo y, por lo tanto, también la toxina que producen. Durante las últimas dos décadas se ha detectado la presencia de azaspirácidos en mariscos de países costeros de toda Europa (Irlanda, Inglaterra, Noruega, Francia, España, Portugal e Italia), además de en otras regiones como el norte de África, China, Norteamérica y Sudamérica, en concreto en Chile y Argentina (Dhanji-Rapkova et al., 2019). En la figura 5 se muestra la distribución mundial de la expansión de estos dinoflagelados.

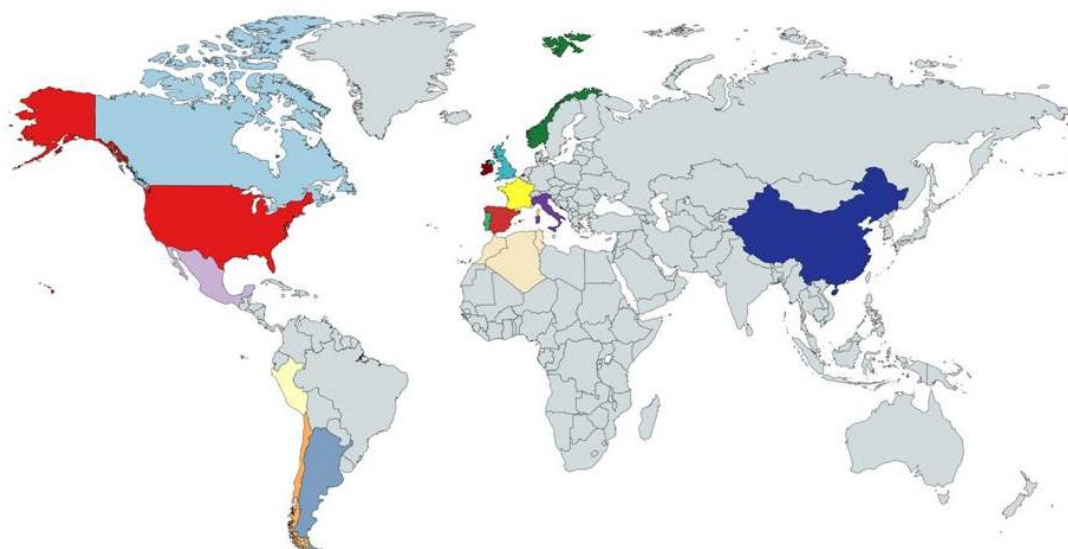


Figura 5. Distribución mundial de los dinoflagelados del género *Azadinium*. Mapa adaptado de <https://mapchart.net/world.html>.

A pesar de las numerosas investigaciones que se han llevado a cabo, el mecanismo de acción de los azaspirácidos sigue siendo desconocido y objeto de controversia. Los diferentes estudios de toxicidad *in vitro* realizados con el objetivo de intentar elucidar el mecanismo de acción de estos compuestos, mostraron que uno de los principales efectos observados era neurotoxicidad junto con alteración de la estructura del citoesqueleto, acompañada de cambios en la forma celular y pérdida de la adherencia de las neuronas al sustrato (Vilarino et al., 2006; Vale et al., 2007; Vilarino et al., 2007; Vilarino, 2008; Vale et al., 2010). Se demostró además que las alteraciones del citoesqueleto eran irreversibles después de la retirada de la toxina del medio de cultivo (Vilarino et al., 2006). Se han descrito además otros efectos *in vitro* de los azaspirácidos que podrían estar relacionados con cambios en el citoesqueleto, como la degradación de E-cadherina y la muerte celular por apoptosis asociada a la activación de caspasas (Vilarino, 2008). Adicionalmente, los estudios de toxicidad realizados *in vivo*, administrando azaspirácidos a ratones tanto por vía oral como por vía intraperitoneal, han mostrado que estos compuestos producían lesiones a nivel del tubo gastrointestinal (donde se muestra la sintomatología) y también daños a nivel hepático, pancreático, pulmonar y esplénico (Twiner et al., 2008). Recientemente, un estudio *in vitro*, empleando las mismas células que las empleadas en este trabajo, indicó que los azaspirácidos no bloqueaban la activación de canales de sodio dependientes de voltaje (VGSCs) si no era en presencia simultánea de ácido glutámico (Chevallier et al., 2015). Sin embargo, este trabajo se realizó empleando equipos automáticos para determinar el efecto de la toxina sobre los canales de sodio dependientes de voltaje. Posteriormente, el mismo equipo demostró que los azaspirácidos bloqueaban parcialmente estos canales de sodio dependientes de voltaje en células embrionarias de riñón humano (HEK293

Na_v1.7), un efecto que parecía estar relacionado con modificaciones en el citoesqueleto celular pero no con la elevada citotoxicidad de estos compuestos (Boente-Juncal et al., 2020).

Canales de sodio dependientes de voltaje

Los canales de sodio activados por voltaje son proteínas grandes y complejas que se encuentran incrustadas en la membrana celular. Están compuestos por una subunidad α y una o más subunidades β . La subunidad α es suficiente para la expresión funcional del canal, pero la cinética y la activación dependiente de voltaje del canal son modificadas por las subunidades β . Estas subunidades auxiliares están involucradas en la localización e interacción del canal con las moléculas de adhesión celular, la matriz extracelular y el citoesqueleto intracelular. La subunidad α está a su vez compuesta por cuatro dominios homólogos (DI – DIV), cada uno de los cuales contiene seis hélices α transmembrana (S1 – S6) y un bucle de poro adicional ubicado entre los segmentos S5 y S6 como se muestra en la figura 6 (Wisedchaisri et al., 2019).

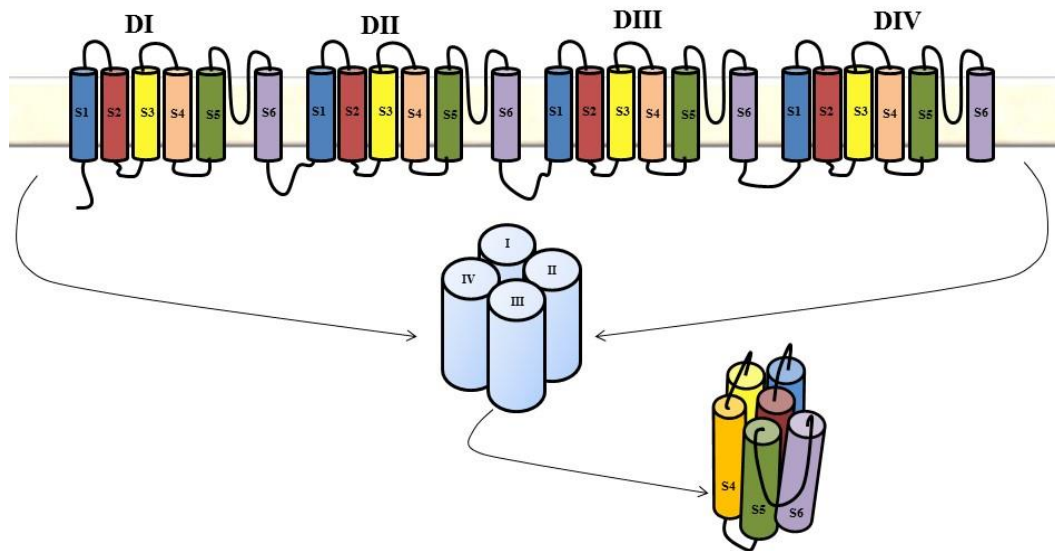


Figura 6. Estructura de la subunidad alfa de un canal de sodio dependiente de voltaje. (Arriba) Dominios transmembrana (DI–DIV), los segmentos transmembrana correspondientes a cada dominio (S1– S6) y sus bucles de conexión. Los bucles de poro, que se sumergen en la membrana, forman el filtro de selectividad iónica. En la parte central de la figura se muestra cómo se agrupan los 4 dominios para formar la proteína y su poro. En la parte de abajo figura la estructura la de uno de los dominios con el bucle de poro en primer plano. Figura modificada de (Liebeskind et al., 2011).

Las células que de forma natural expresan estos canales de sodio dependientes de voltaje son las del sistema nervioso central, incluido el cerebro, sistema nervioso periférico y células musculares, incluido el músculo cardíaco. Más concretamente, la subunidad 1.7 de estos

canales se expresa principalmente en las neuronas sensoriales, contribuyendo a la transmisión de la nocicepción (Zhao et al., 2016).

Citoesqueleto de actina

Como ya se ha mencionado, el bloqueo parcial de los canales de sodio dependientes de voltaje que producen los azaspirácidos (Boente-Juncal et al., 2020) podría estar relacionado con las modificaciones en el citoesqueleto celular que se observan tras el tratamiento de las células con azaspirácidos debido a la interacción de la subunidad β de los canales con las moléculas del citoesqueleto.

El citoesqueleto celular es una estructura que permite a las células mantener su forma y su organización interna y además proporciona un soporte mecánico que habilita a las células para el desarrollo de funciones esenciales tales como la división y el movimiento celular (<https://www.nature.com/scitable/ebooks/essentials-of-cell-biology-14749010/118240354/>).

Una de las proteínas del citoesqueleto es la actina, descubierta en el músculo esquelético pero muy abundante en todas las células eucariotas. En la mayoría de las células existen redes de filamentos de actina que se encuentra dentro del citoplasma y permiten a las células adoptar formas especializadas, pero además el citoesqueleto de actina participa en la citoquinesis y en el movimiento celular. En la figura 7 se muestra la disposición de las principales proteínas del citoesqueleto.

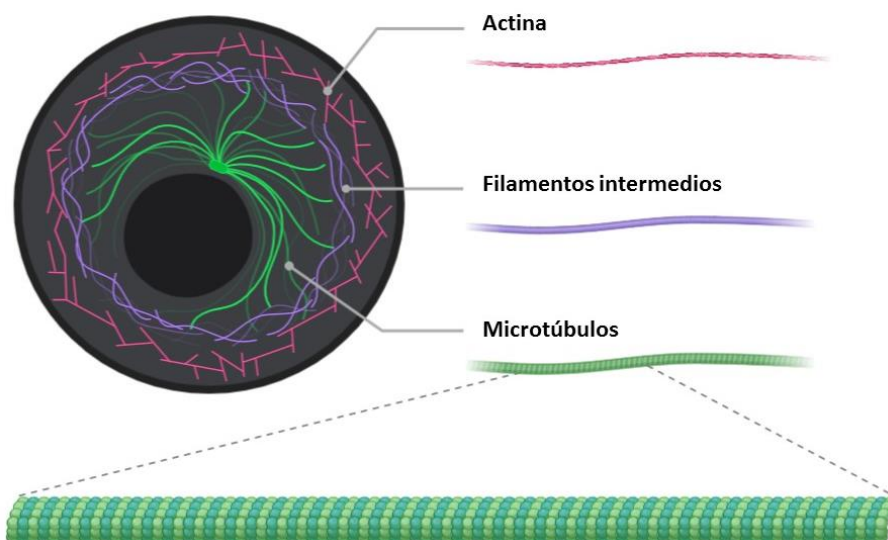


Figura 7. Disposición de las principales proteínas del citoesqueleto. Figura modificada del programa Biorender (<https://app.biorender.com/>).

El citoesqueleto de actina puede regular receptores de neurotransmisores y canales iónicos (Shaw and Koleske, 2020). De hecho, hoy en día se ha demostrado que la actina regula los canales iónicos a través de diversos mecanismos y que esta regulación puede ser indirecta,

puesto que la actina regula el agrupamiento de los canales o directa ya que la actina puede modificar la conductancia de los canales dependientes de voltaje y también su probabilidad de apertura y su inactivación (Janmey, 1998; Shaw and Koleske, 2020). En la figura 8 se muestra un esquema que resume el modelo de interacción de la actina con los canales iónicos.

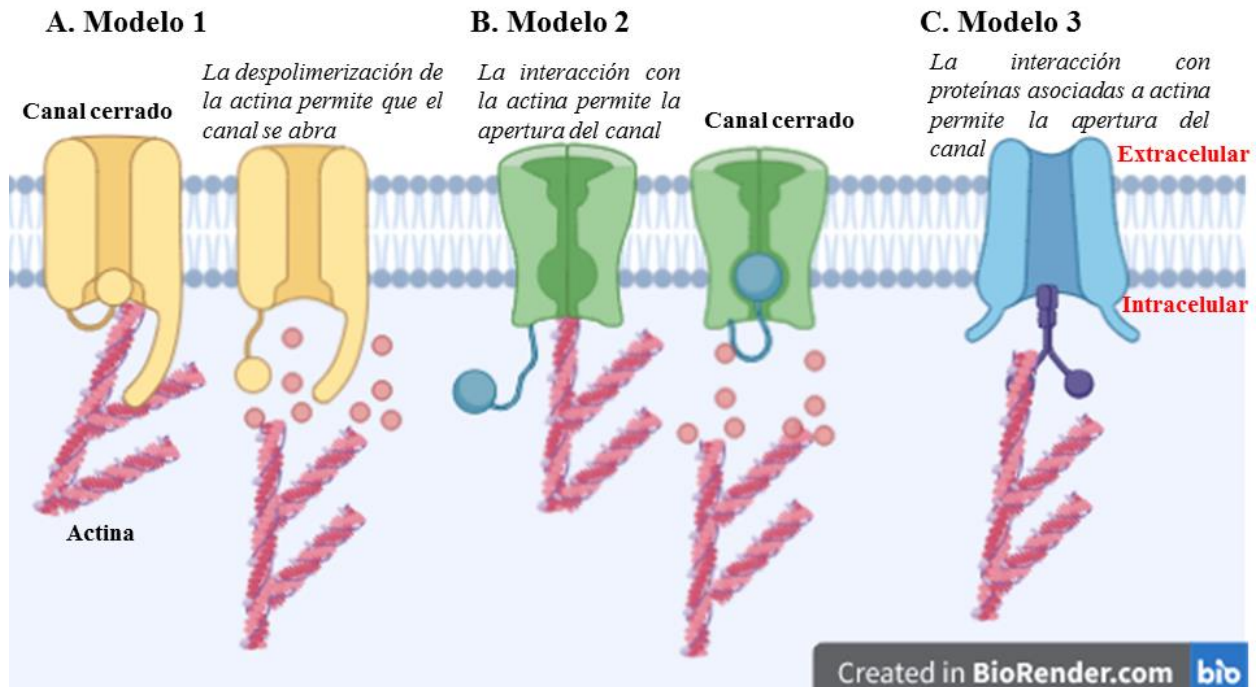


Figura 8. Esquema que resume la interacción de la actina con los canales iónicos y su participación en la activación e inactivación de los mismos. A, Modelo 1: los filamentos de actina pueden interaccionar con un canal iónico para mantenerlo fijado en una conformación cerrada. La despolimerización de la actina provocará la desaparición de esta restricción y permitirá la apertura del canal. B, Modelo 2: los filamentos de actina pueden unirse al canal y permitir que este se abra. C, Modelo 3: las proteínas de anclaje de la actina pueden unirse al canal y permitir que el canal se abra. Imagen adaptada de (Shaw and Koleske, 2020).

En el caso de canales de sodio no operados por voltaje la unión de los extremos positivos de la actina con la citocalasina (metabolito de origen fúngico que impide la polimerización de la actina) hace que el receptor se active (Shumilina et al., 2003), lo que sugiere un mecanismo a través del cual la interacción con la actina mantiene al canal en una conformación inactiva que desaparece con la pérdida de acoplamiento del canal con la actina (Figura 8A). En el caso de los canales de cloro y del canal de potasio $K_v3.3$ (Schwiebert et al., 1994) la interacción del canal con la actina permite que el canal permanezca abierto (Figura 8B). Además de que la unión de la actina puede modificar la activación e inactivación de los canales, los filamentos de actina están unidos a proteínas de anclaje que pueden afectar a la actividad del canal iónico. Por lo tanto es también posible que los cambios en la localización de proteínas del citoesqueleto que interaccionan con la actina pueda afectar el funcionamiento del canal (Figura 8C) (Shumilina et al., 2003).

Objetivos

Los objetivos principales de este Trabajo Fin de Grado se han centrado en reevaluar la toxicidad *in vitro* de los azaspirácidos y sus efectos sobre la morfología celular. El planteamiento de este objetivo se basa en que todos los estudios previos encaminados a elucidar el mecanismo de acción de los azaspirácidos han sido realizados bien con toxinas extraídas mediante diferentes métodos o con análogos sintetizados químicamente, sin embargo, desde hace relativamente poco se dispone de material certificado de referencia para evaluar el efecto de estos compuestos. Por lo tanto, teniendo en cuenta el reciente descubrimiento del efecto de los azaspirácidos sobre los canales de sodio dependientes de voltaje y su conocido efecto sobre el citoesqueleto de actina los objetivos de este Trabajo de Fin de Grado han sido:

1. Reevaluar la citotoxicidad *in vitro* de los dos principales análogos naturales de los azaspirácidos (AZA-1 y AZA-2) en células neuronales de origen humano (neuroblastoma) y en células de riñón que expresan los canales de sodio dependientes de voltaje Na_v1.7.
2. Analizar los efectos del AZA-1 sobre la morfología celular en células que expresan canales de sodio dependientes de voltaje (HEK293 Na_v1.7).

Material y métodos

Toxinas y reactivos utilizados

Se han utilizado para realizar los ensayos de toxicidad *in vitro* los análogos azaspirácido 1 y azaspirácido 2 que fueron comprados a la empresa CIFGA S.L. (Lugo) y están disponibles como material de referencia certificado con una pureza mayor del 98 %. Las toxinas se disolvieron en metanol obteniendo una concentración final de 12.94 μM para el AZA-1 y de 12.38 μM para el AZA-2. Las diluciones posteriores se realizaron en tampón fisiológico Locke's que contenía en mM: 154 NaCl, 5.6 KCl, 1.3 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanosulfónico) y 5.6 glucosa (pH 7.4). En todos los experimentos la máxima concentración de disolvente usada fue del 1%. Todos los otros reactivos fueron de grado analítico y comprados a Sigma (Merck Life Science S.L.U., Madrid).

Líneas celulares empleadas

Para estudiar la toxicidad *in vitro* de los azaspirácidos se han empleado dos tipos de líneas celulares humanas:

- Células embrionarias de riñón humano (HEK293) transfectadas con la subunidad 1.7 del canal de sodio dependiente de voltaje (Na_v1.7), es decir, que expresan esta subunidad del canal. Estas células han sido proporcionadas al laboratorio mediante un acuerdo de transferencia de material con los laboratorios GlaxoSmithKline (GSK, R&D, Stevenage, UK).
- Células de neuroblastoma humano SH-SY5Y obtenidas del ATCC (del inglés American Type Culture Collection) número CRL-2266 (Virginia, Estados Unidos).

Cultivo de células HEK293

Para cultivar las células HEK293 se empleó un medio preparado en el laboratorio que contiene DMEM/F12 (Dulbecco's modified Eagles medium Gibco, 1:1) el cual se suplementa con un 10% de suero fetal bovino (FBS, del inglés fetal bovine serum, Gibco), un 1% de una solución comercial de aminoácidos no esenciales (DMEN-NEAA, del inglés non essential aminoacids, Gibco) y 1% glutamina (Gibco). Finalmente, también se añade al medio de cultivo geneticina (Gibco) a una concentración de 400 $\mu\text{g/ml}$, como antibiótico para seleccionar únicamente las células que expresan la subunidad Na_v1.7 de los canales de sodio dependientes de voltaje. Las células se sembraron en frascos de cultivo que se mantienen en incubadores a temperaturas de 30 o de 37 °C con una atmósfera de 5% CO₂/95% O₂ y 95-98% de humedad.

Una vez que las células alcanzan un 80 % de confluencia, se trataron con diferentes concentraciones de los análogos de azaspirácidos 1 y 2 durante 48 horas en el medio de cultivo.

Cultivo de células de neuroblastoma humano

Las células SH-SY5Y se sembraron en frascos de cultivo de 25 cm² y se cultivaron siguiendo procedimientos previamente descritos (Boente-Juncal et al., 2019). En resumen, las células no diferenciadas se cultivaron en DMEM/F12 (1:1) suplementado con 10% de FBS y antibióticos (100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina). El cultivo se realizó en placas de 48 pocillos y cuando las células alcanzaron el 80% de confluencia se trataron con diferentes concentraciones de AZA-1 y AZA-2 durante 48 h en el medio de cultivo antes de evaluar el efecto citotóxico.

Ensayos de valoración de la citotoxicidad *in vitro* de los azaspirácidos

A continuación, se describen los dos ensayos de citotoxicidad para valorar el efecto *in vitro* de los azaspirácidos sobre las líneas celulares humanas que se han basado en el empleo de dos marcadores de la actividad metabólica: El MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-ilo]-2,5-difeniltetrazol) y el alamar blue.

MTT

El ensayo de MTT fue desarrollado por Mossman en el año 1983 (Mosmann, 1983). Este compuesto, perteneciente a la familia de las sales de tetrazolio, permite determinar el número de células viables que quedan en un cultivo tras el tratamiento con una sustancia, en este caso azaspirácido 1 y azaspirácido 2, y así, por lo tanto, evaluar la toxicidad de estas sustancias. Tras el cultivo de las células y posterior tratamiento con AZA-1 y AZA-2, se procede a llevar a cabo el ensayo del MTT. Este ensayo se basa en una reacción colorimétrica puesto que cuando el MTT penetra en las células viables con un metabolismo activo, las deshidrogenasas mitocondriales reducen el MTT que es de color amarillo a un compuesto, formazán insoluble, que es de color violeta. Tal como se indica en la figura 9 la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial depende de la concentración intracelular de NADH (nicotinamida adenina dinucleótido), durante este proceso, el NADH es reducido a NAD⁺ y así el MTT se convierte en formazán (Khor Goot Heah, 2017). La cantidad de formazán que se produce es directamente proporcional al número de células viables en el cultivo mientras que las células metabólicamente inactivas pierden la capacidad de convertir el MTT en formazán (Ganot et al., 2013).

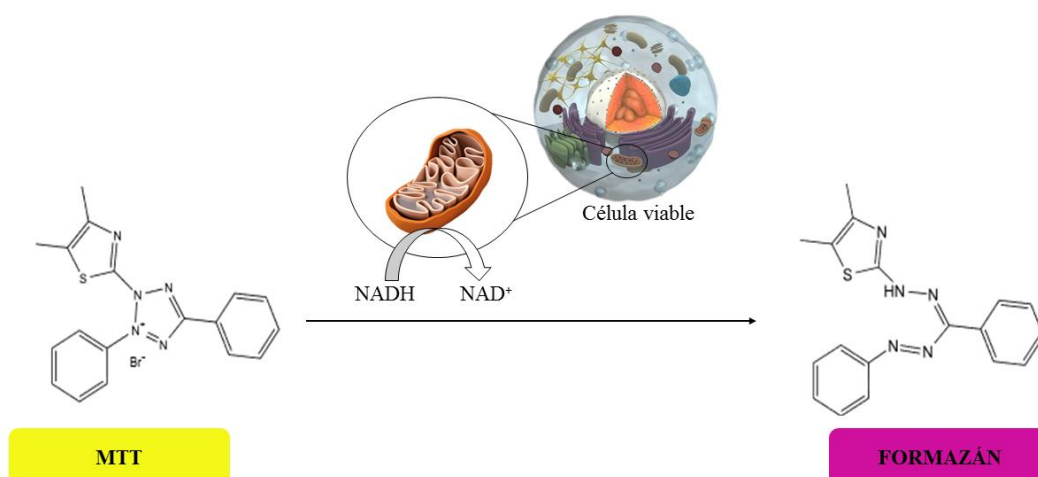


Figura 9. Esquema que muestra la estructura química del MTT (amarillo), del formazán (violeta) y el proceso de reducción del MTT por las deshidrogenasas mitocondriales.

El formazán, producto del MTT, se acumula como un precipitado insoluble dentro de las células. Este formazán se debe de solubilizar antes de llevar a cabo las lecturas de absorbancia, puesto que no hacerlo produciría resultados erróneos. Se pueden añadir una amplia variedad de sustancias para solubilizar el formazán, como pueden ser el isopropanol, dimetilsulfóxido (DMSO), dodecilsulfato sódico (SDS) y algunas combinaciones de detergentes y proteínas orgánicas (Riss et al., 2004). La cuantificación de la actividad mitocondrial tras realizar ese ensayo se ha llevado a cabo mediante la lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en un lector multimodal de microplacas (Synergy, Biotek), obteniendo así unos valores numéricos. Los resultados obtenidos, se analizaron empleando el programa GraphPad Prism que permite calcular la toxicidad de los azaspirácidos y determinar su IC_{50} (Concentración inhibitoria 50) o concentración de toxina que produce la muerte de la mitad de las células en cultivo (Ganot et al., 2013).

ALAMAR BLUE

Este ensayo que mide la actividad metabólica emplea un indicador redox denominado resazurina (7-hidroxi-3 H fenoxazina-3-ona 10-óxido). La resazurina es soluble en agua, estable en el medio de cultivo, no tóxica y permeable a través de las membranas celulares (Rampersad, 2012). Este indicador se añade directamente al medio de cultivo celular permitiendo así el seguimiento de la viabilidad celular durante el tiempo de tratamiento (Riss et al., 2004). El ensayo consiste en una reacción colorimétrica mediante la cual las células viables con metabolismo activo pueden reducir la resazurina dando como resultado resorufina. La cantidad de resorufina producida es proporcional al número de células viables (Riss et al., 2004). La resazurina actúa como un aceptor de electrones intermedio en la cadena de transporte de electrones sin interferir en la transferencia normal de estos. A medida que el indicador acepta

electrones, cambia del color azul oxidado, no fluorescente al estado reducido, fluorescente, de color rosa como se muestra en la figura 10. Por lo tanto, una disminución de resorufina indica un deterioro del metabolismo celular.

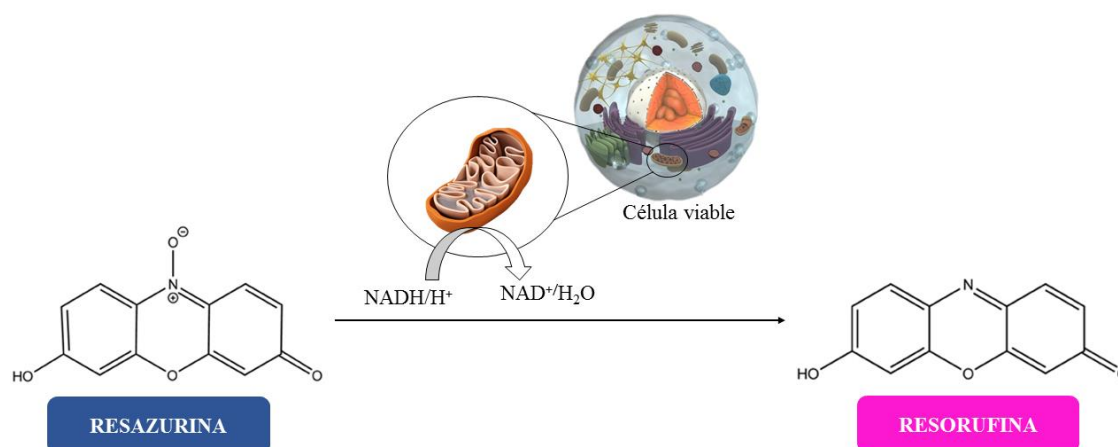


Figura 10. Esquema que muestra la estructura química de la resazurina (azul) y de la resorufina (rosa) y el proceso de reducción de la resazurina en células metabólicamente activas.

Este cambio de estado oxidado a reducido permite flexibilidad en la detección. Las mediciones pueden ser cuantitativas y realizarse indistintamente mediante pruebas colorimétricas o fluorométricas (Riss et al., 2004). Empleando este método, el período de incubación requerido para generar una señal fluorescente adecuada suele ser de entre 1 y 4 horas. Es muy importante durante la incubación tener en cuenta que el alamar blue es fotosensible y las incubaciones deben ser hechas en la oscuridad para evitar que se degrade. La señal obtenida depende también de la actividad metabólica y del tipo de célula empleada además de la densidad celular por pocillo, el medio de cultivo y otras condiciones del ensayo (Riss et al., 2004).

Cultivo celular

Para poder realizar los ensayos de toxicidad sobre las células, estas deben ser subcultivadas en placas de cultivo. Para ello, después de sembrar las células HEK293 $\text{Na}_v1.7$ en frascos de cultivo se deben mantener en las condiciones indicadas previamente durante 2-3 días, tiempo que suelen tardar en alcanzar el 80% de confluencia tal como se muestra en la figura 11.

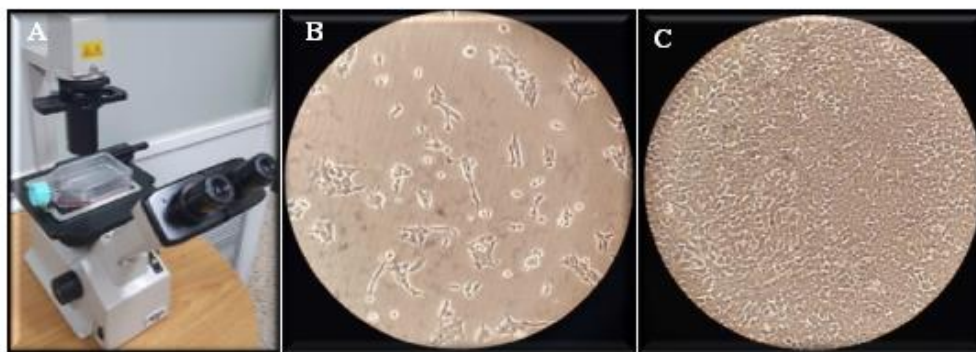


Figura 11. Observación de un frasco de cultivo en el microscopio (A). En la imagen B se muestran las células después de 6 horas de cultivo con muy poca confluencia. En la imagen C se muestran las células con más de un 80 % de confluencia.

Una vez alcanzado el 80 % de confluencia en los frascos de cultivo, las células se pasan a placas de cultivo o bien a placas de cultivo con cubreobjetos. Las células se siembran a una densidad de 30000 células/ml. Para ello, se lavan las células con DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) estéril para retirar los restos de medio que previamente ha sido aspirado. A continuación, se añade una solución estéril que contiene tripsina y EDTA (ácido etilendiaminotetraacético). Debido a su actividad enzimática, la tripsina se emplea ampliamente en el subcultivo de células, puesto que levanta las células que se encontraban adheridas a la superficie del frasco de cultivo. Tras esto se mantiene el frasco en un incubador a 37 °C durante 2-3 minutos y se golpean las paredes del frasco de cultivo para que las células se desprendan del todo de la superficie del plástico. La actividad de la tripsina es inactivada añadiendo medio de cultivo con FBS al frasco y la suspensión celular obtenida se centrifuga durante 5 minutos a 1000 revoluciones por minuto (rpm) a excepción de un pequeño volumen que se emplea para el conteo de la densidad celular en una cámara de Thoma. Una vez centrifugada la suspensión celular, se elimina el sobrenadante y las células, que han precipitado al fondo, se resuspenden en 10 ml de medio. Según los resultados obtenidos en el conteo de la densidad celular en la cámara de Thoma se sembrará un determinado volumen en cada pocillo. Las placas una vez sembradas, deben ser mantenidas en las mismas condiciones indicadas para los frascos de cultivo hasta que se alcance en cada pocillo una confluencia de al menos el 80%.

Mientras las células se mantienen en diferenciación, el crecimiento celular ocasiona un empobrecimiento del medio al consumirse los nutrientes y acumularse los productos metabólicos, por lo tanto, cada 2 o 3 días se debe cambiar el medio en el que se mantienen las células, aspirando la mitad del volumen de medio y sustituyéndolo por el mismo volumen de medio fresco que el volumen retirado, tanto en los pocillos de las placas de cultivo como en los frascos de cultivo.

Antes de realizar los tratamientos con la toxina a estudiar se debe observar la placa de cultivo al microscopio para comprobar que el crecimiento celular en los pocillos es uniforme y las células están vivas en todos ellos. En caso de que en algún pocillo no sea así, se debe apuntar para descartarlo del experimento puesto que, de no hacerlo, podría llevar a error.

Tratamiento de las células con azaspirácidos y determinación de la viabilidad celular

Para realizar el ensayo del MTT las células HEK293 Na_v1.7 o las células de neuroblastoma se sembraron en placas de cultivo de 96 o 48 pocillos y se trataron durante 48 horas con los azaspirácidos (AZA-1 y AZA-2) a concentraciones crecientes desde 1 nM hasta 50 nM (1, 10, 30 y 50 nM). Como control de muerte se usó DMSO al 10 %. Una vez finalizado el periodo de tratamiento, en los primeros ensayos se realizó primero una aspiración del medio que contenía cada pocillo y un lavado de cada uno de los mismos con Locke's con el objetivo de eliminar las células muertas. Posteriormente se añadió en cada uno de los pocillos una disolución de 500 µg/ml de MTT disuelto en Locke's. A continuación la placa se incubó durante 60 minutos en un incubador de placas a 37 °C, en agitación constante (a 300 rpm) y en la oscuridad para evitar la degradación del MTT. Tras la incubación, se aspiró el MTT y se añadió a cada uno de los pocillos SDS al 5% (disuelto en agua) para disgregar las células. La placa se mantiene con el SDS toda la noche sellada con parafilm y envuelta en papel de aluminio para protegerla de la luz. Con este procedimiento se observó que las células se desprendían de la placa pero se mantenían viables. Finalmente, la absorbancia emitida se lee a 595 nm en un lector multimodal de placas Synergy 4 de Biotek. Puesto que este procedimiento producía datos erróneos ya que las células se despegaban durante el tratamiento, se realizó exactamente el mismo ensayo pero añadiendo el MTT directamente al medio de cultivo, lo que evitaba el desprendimiento celular.

Para el ensayo del alamar blue las células se trataron igual que para el ensayo del MTT pero el alamar blue (dilución 1:10) se añadió directamente al medio de cultivo. En este caso se midió la absorbancia a 570 y 600 nm en un lector multimodal de placas Synergy 4 de Biotek una vez transcurridas 20 y 48 horas.

Tinción de la membrana celular

Para evaluar la morfología celular inicialmente se realizó una tinción de la membrana en células vivas. Para ello, las células control y las células tratadas con las toxinas, cultivadas en cubreobjetos en placas de 12 pocillos, se incubaron con un marcador de la membrana celular denominado “CellMask Deep Red plasma membrane stain” durante 15 minutos a 37 °C (Molecular Probes, Invitrogen). Este marcador se excita a 649 nm y emite fluorescencia a 666 nm, el espectro se muestra en la figura 12. El producto comercial se disolvió en una disolución

para imagen proporcionada por el fabricante y siguiendo las instrucciones del mismo. Después de la incubación, se retiró el marcador mediante aspiración y las células se lavaron con la solución comercial. Los cubreobjetos se montaron con líquido de montaje compuesto por 0.5 ml de PBS (PBS, del inglés phosphate buffered saline que contiene: NaCl 137 mM, Na_2HPO_4 8.2 mM, KH_2PO_4 1.5 mM y KCl 3.2 mM) y 4.5 ml de glicerol y se observaron inmediatamente en un microscopio confocal (Nikon, Mellville, NY).

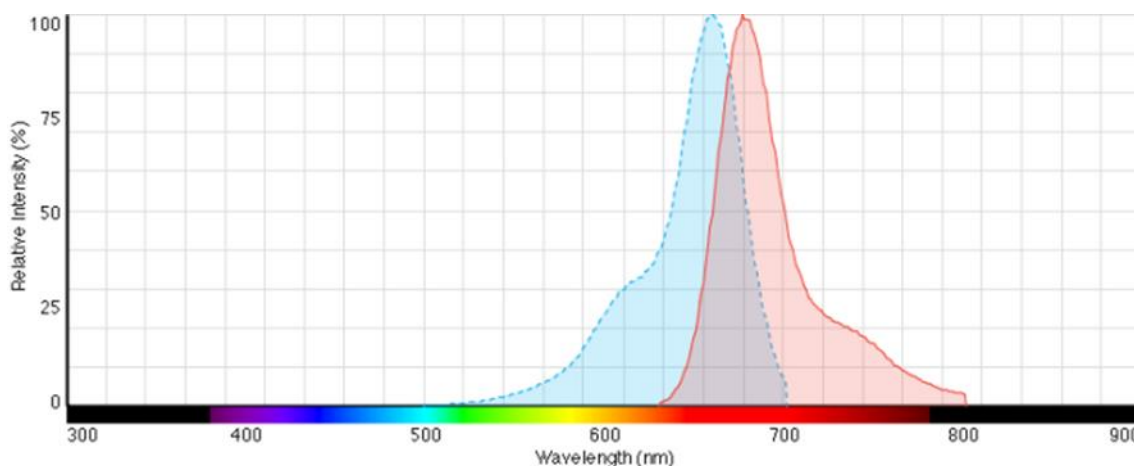


Figura 12. Espectro que muestra las longitudes de onda de excitación (línea punteada) y de emisión (línea continua) para el indicador CellMask Deep Red. Thermofisher (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C10046#/C10046>).

Inmunocitoquímica y análisis microscópico

Para realizar la inmunocitoquímica, las células se cultivaron en cubreobjetos en placas de cultivo de 12 pocillos, hasta alcanzar al menos el 80% de confluencia. Las células control y las células tratadas con azapirácidos durante 48 horas se lavaron con tampón fosfato (PBS) a pH 7.2-7.4. A continuación, se fijaron durante 10 minutos con una disolución que contiene paraformaldehído al 4% y sacarosa al 4% disueltos en PBS. Tras la fijación las células se lavaron 2 veces durante 10 minutos con PBS. A continuación se realizó un bloqueo con PBS, 5% de albúmina de suero bovino (BSA, del inglés bovine serum albumin) y 0.1% de tritón X-100 durante 40 minutos para evitar que el anticuerpo se una a lugares inespecíficos. Para observar los cambios en el citoesqueleto, se empleó un anticuerpo primario anti-actina monoclonal de ratón (Millipor) a una dilución 1:500 disuelto en PBS, 2% de BSA y 0.1% de tritón X-100 y las células se incubaron toda la noche en agitación a 4° C. Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS (10 minutos cada uno) y se añadieron los anticuerpos secundarios (1:1000) diluidos en PBS 2% de BSA y 0.1% de tritón. Puesto que se quería optimizar el experimento se emplearon dos anticuerpos secundarios:

- Cy3 de ratón. Se excita a 560 nm y emite a 580 nm.
- Alexa flúor 488 de ratón. Se excita a 493 nm y emite a 518 nm.

Los espectros de excitación y emisión de estos anticuerpos secundarios se muestran en las figuras 13 y 14, respectivamente. Las células se incubaron con el anticuerpo secundario fluorescente durante 1 hora a temperatura ambiente tapando la placa con papel de aluminio para protegerla de la luz. Una vez finalizada la incubación las células se lavaron 3 veces con PBS durante 10 minutos. Antes de realizar el último lavado se añadió Hoechst 33342 ((tri hidrocloreuro de (2'-[4-etoxifenilo]-5-[4-metil-1-piperazinilo]-2,5'-bi-1Hbenzimidazol)), NucBlue Live Cell Stain ready probes, Invitrogen). El Hoechst atraviesa la membrana celular y se vuelve fluorescente al unirse al ADN por lo que permite visualizar el núcleo celular. Se excita a 360 nm y emite fluorescencia a 460 nm. El Hoechst se añadió a una dilución 5:1000 en PBS y tras 5 minutos se realizaron 3 lavados adicionales con PBS.

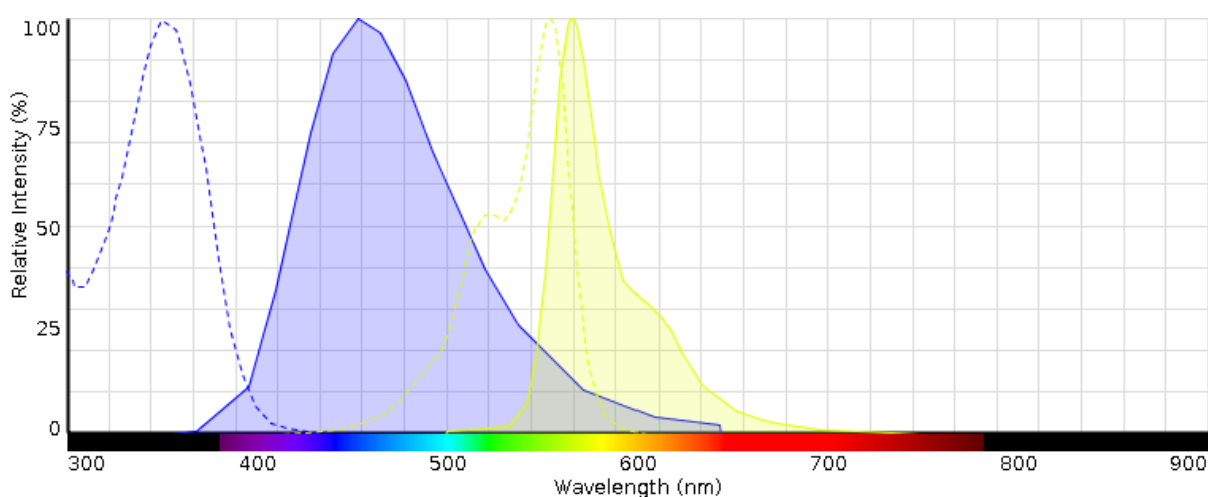


Figura 13. Espectro que muestra las longitudes de onda de excitación (línea punteada) y de emisión (línea continua) para Hoechst (azul) y Cy3 (amarillo). (<https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html?SID=fr-probe-4>).

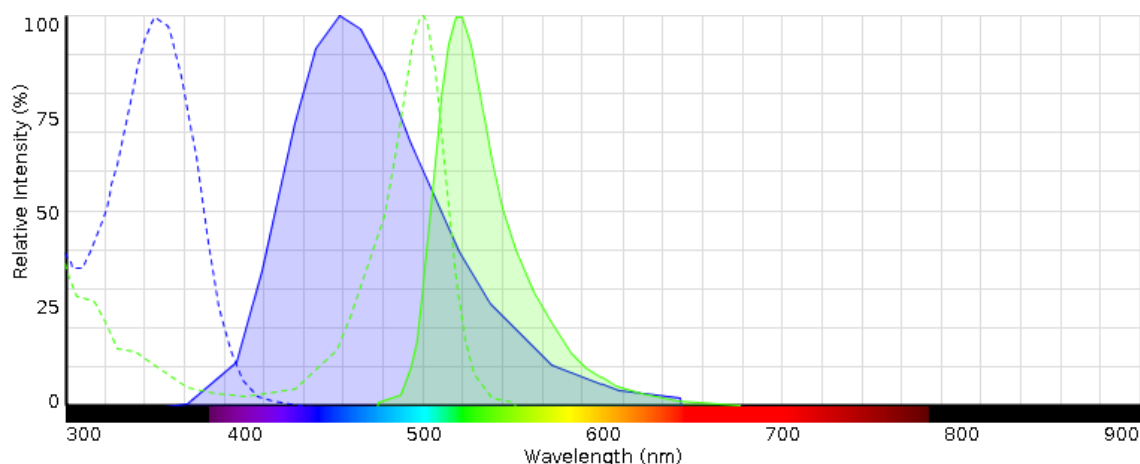


Figura 14. Espectro que muestra las longitudes de onda de excitación (línea punteada) y de emisión (línea continua) para Hoechst (azul) y Alexa fluor 488 (verde). Obtenido en <https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html?SID=fr-probe-4>.

Por último, para visualizar las células en el microscopio confocal, los cubreobjetos se cubrieron con líquido de montaje, se colocaron sobre un portaobjetos previamente etiquetado y se sellaron con laca de uñas para su posterior observación al microscopio confocal (Nikon, Mellville, NY), con los objetivos de 40x y 60x añadiendo aceite de inmersión. El efecto de los azaspirácidos sobre la morfología celular se estudió manteniendo las células en cultivo a 30 °C (para incrementar la expresión de los canales Na_v 1.7) y a 37 °C.

Análisis estadístico

Para el análisis del efecto de los azaspirácidos sobre la viabilidad celular, los datos se expresaron como la media \pm SEM (error estándar de la media) de n repeticiones. Se realizó una comparación estadística empleando el test t de Student. Los valores $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos. Las gráficas se obtuvieron mediante el software GGraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc.) empleando una curva dosis respuesta para calcular las IC₅₀.

Resultados

Puesto que anteriormente se había demostrado que los azaspirácidos tenían efectos citotóxicos *in vitro* (Vilarino et al., 2006; Vale et al., 2007), en primer lugar se evaluaron los efectos de los análogos AZA-1 y AZA-2 sobre la viabilidad de células de neuroblastoma y células HEK293 Na_v1.7 siguiendo protocolos previamente descritos, es decir lavando las células con Locke's y añadiendo posteriormente el MTT (Vale et al., 2007).

Efecto de los azaspirácidos sobre la viabilidad celular empleando el ensayo del MTT

En las figuras 15 y 16 se demuestra que mediante esta aproximación los azaspirácidos disminuyen la viabilidad celular de forma dependiente de la concentración tanto en neuroblastoma como en células HEK293 Na_v1.7. En primer lugar se evaluó el efecto de la exposición de células de neuroblastoma humano a AZA-1 y a AZA-2 siguiendo el protocolo previamente descrito incubando y lavando las células con tampón Locke's antes de realizar el ensayo MTT. En la figura 15 se muestra que en estas condiciones ambos compuestos disminuyeron la viabilidad celular prácticamente al 100 % con IC₅₀ de 19.7×10^{-9} M y 8.4×10^{-9} M, respectivamente.

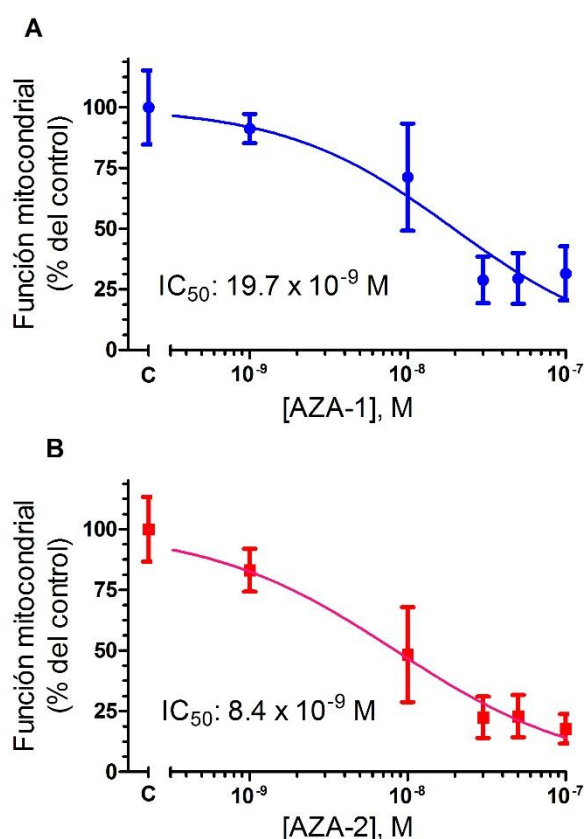


Figura 15. Efecto de diferentes concentraciones de AZA-1 (A) y AZA-2 (B) sobre la función mitocondrial en células de neuroblastoma humano expuestas durante 48 horas a diferentes

concentraciones de toxina y sometidas a lavados con tampón fisiológico antes de la realización del ensayo. Los datos representan la media \pm SEM de tres experimentos independientes realizados en triplicado.

Siguiendo el mismo protocolo se evaluó el efecto del AZA-1 sobre la viabilidad de las células HEK293 Na_v1.7 como se muestra en la figura 16. En este caso también se obtuvo una IC₅₀ de 3.9×10^{-9} M (95 % intervalo de confianza (IC): 2.7 hasta 5.7×10^{-9} M), con toxicidad máxima de aproximadamente 75% después de 48 horas de tratamiento de las células con las diferentes concentraciones de AZA-1.

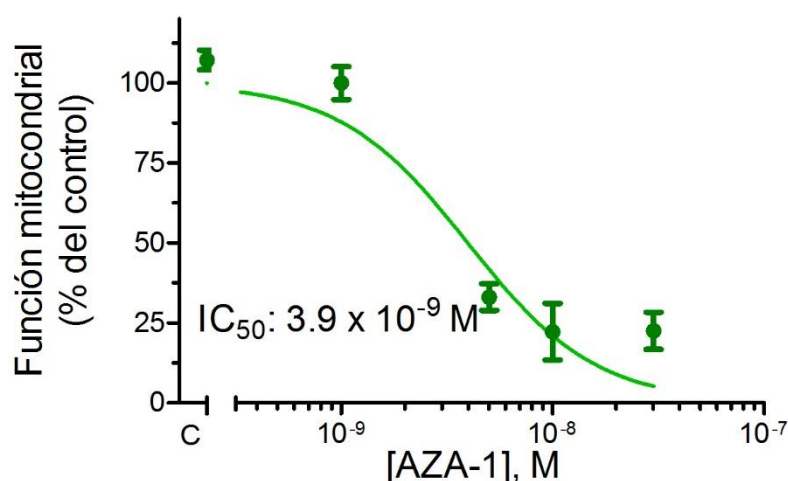


Figura 16. Efecto del azaspirácido sobre la viabilidad de las células HEK293 Na_v1.7 cuando el protocolo del MTT se realiza en medio Locke's. Los datos representan la media \pm SEM de tres experimentos independientes, cada uno realizado en triplicado.

Durante el curso de estos experimentos se observó que muchas células eran viables, pero se despegaban de la placa. Por lo tanto, se reevaluó la citotoxicidad añadiendo el MTT directamente al medio de cultivo, tal como se muestra en la figura 17. En estas condiciones, al no realizar lavados las células no se despegaron de la placa y se obtuvo una gráfica de viabilidad completamente diferente. Con esta aproximación, las células no se despegaron de las placas y como consecuencia el tratamiento de las células HEK293 con AZA-1 a concentraciones entre 1 y 50 nM durante 48 horas no afectó la viabilidad celular. Este resultado está de acuerdo con datos previos que evaluaron los efectos de AZA-1, AZA-2 y AZA-3 en células hepáticas y que demostraron la ausencia de citotoxicidad después de 24 horas de tratamiento (Pelin et al., 2019).

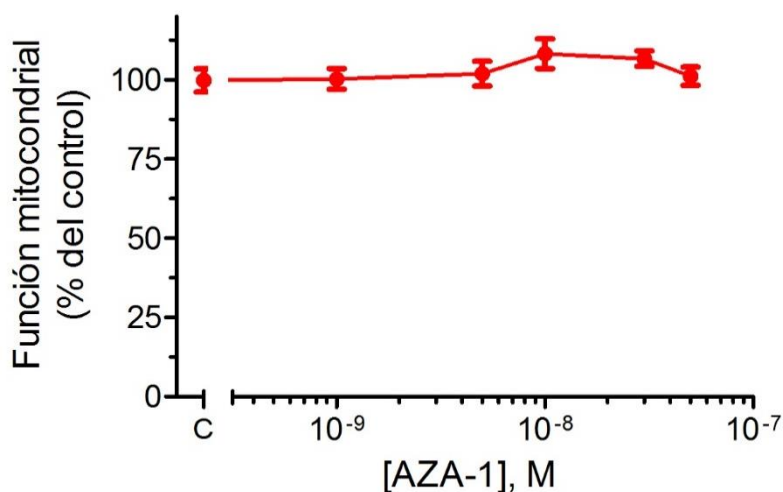


Figura 17. El análogo AZA-1 no modificó la viabilidad celular de las células HEK293 que expresan el canal de sodio $Na_v1.7$ después de 48 horas de tratamiento. La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo del MTT, añadiendo el MTT directamente al medio de cultivo. Los valores representan la media \pm SEM de seis experimentos independientes hechos por triplicado.

En vista de las discrepancias obtenidas en la evaluación de la citotoxicidad celular mediante el ensayo del MTT, y puesto que estudios previos han demostrado que estos compuestos bloqueaban parcialmente los canales de sodio dependientes de voltaje en células HEK293 (Boente-Juncal et al., 2020), a continuación, se evaluó el efecto del bloqueante de canales de sodio tetrodotoxina sobre la adherencia celular. Para ello las células HEK293 se trataron con tetrodotoxina 20 nM previamente a la adición de diferentes concentraciones de azaspirácido al medio de cultivo. Tal como se muestra en la figura 18 la tetrodotoxina no disminuyó el efecto de los azaspirácidos sobre la adherencia celular cuando el ensayo del MTT se realizó en tampón Locke's.

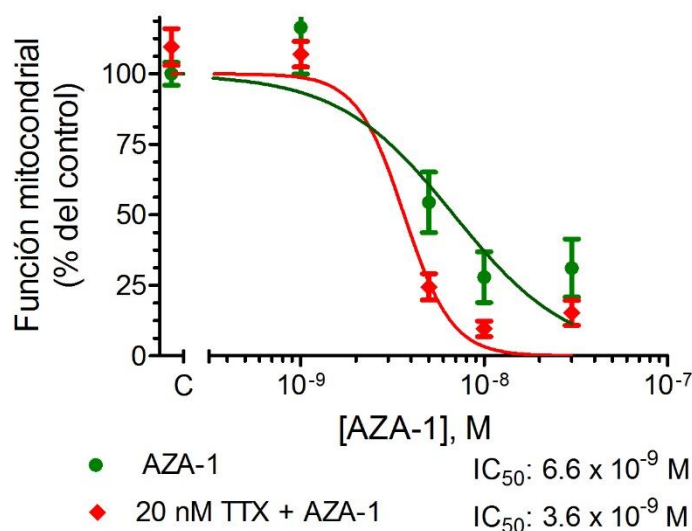


Figura 18. Los bloqueantes de los canales de sodio no afectan al efecto de los azaspirácidos sobre la viabilidad de las células HEK293 Na_v1.7. La preincubación de las células con el bloqueante de los canales de sodio tetrodotoxina no modificó el efecto del AZA-1 sobre la viabilidad celular, cuando el ensayo del MTT se realizó en tampón Locke's. Los datos representan la media \pm SEM de seis experimentos independientes, cada uno realizado en triplicado.

Efecto de los azaspirácidos sobre la viabilidad celular empleando el ensayo del alamar blue

En vista de estos resultados contradictorios se utilizó un ensayo de citotoxicidad adicional que es el ensayo del alamar blue. Las células se trataron con las mismas concentraciones de toxina que las empleadas para la realización del protocolo MTT, durante 48 horas en el medio de cultivo, pero la actividad metabólica se evaluó empleando el ensayo del alamar blue determinando la actividad metabólica a las 20 horas y a las 48 horas de tratamiento. En estas condiciones, tal como se muestra en la figura 19, ambos análogos disminuyeron la actividad metabólica de forma dependiente de la concentración, si bien la máxima disminución de la actividad metabólica se situó en torno al 40 %, tanto a las 20 como a las 48 horas de tratamiento cuando las células fueron expuestas a concentraciones de toxina de 30 y 50 nM. En este caso es de destacar que la disminución de la actividad metabólica se produce durante las primeras 20 horas de exposición de las células a la toxina y no se incrementa con el tiempo de tratamiento.

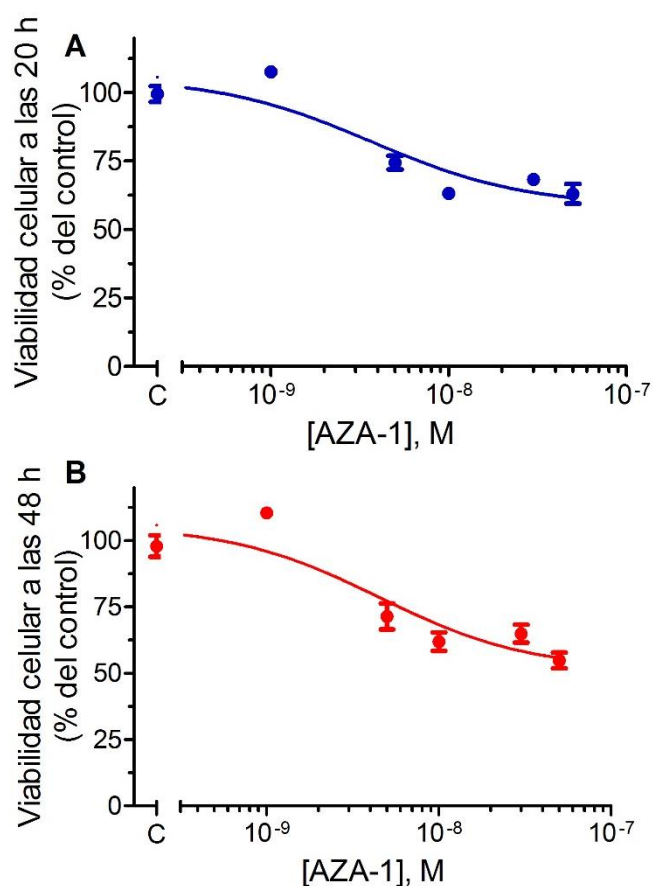


Figura 19. Efecto de las diferentes concentraciones de AZA-1 sobre la viabilidad/proliferación de las células HEK293 que expresan el canal de sodio $Na_v1.7$ tras 20 horas (A) o después de 48 horas (B) de tratamiento de los cultivos con azaspirácido. Los datos representan la media \pm SEM de 6 experimentos independientes en el caso de las 20 horas de tratamiento y de 3 experimentos independientes para los tratamientos realizados durante 48 horas.

Efecto de los azaspirácidos sobre la morfología celular

En vista de las discrepancias obtenidas en el efecto de los azaspirácidos sobre la viabilidad celular con las dos aproximaciones realizadas con el método del MTT o empleando el ensayo del alamar blue se analizó el efecto de estas toxinas sobre la morfología celular. Para realizar estos experimentos se realizaron dos aproximaciones. En primer lugar, se evaluó el efecto de los azaspirácidos sobre la membrana celular utilizando una técnica para teñir directamente la membrana de las células vivas.

Puesto que estudios iniciales sobre el efecto de los azaspirácidos en líneas celulares de neuroblastoma humano demostraron que estas toxinas alteraban el citoesqueleto de actina (Vilarino et al., 2006), y, puesto que, tal como se ha mencionado arriba con el ensayo del MTT se observó que las células se despegaban de la placa tras ser incubadas con las toxinas, el siguiente objetivo de este trabajo fue analizar el efecto de estos compuestos sobre la morfología

celular. Para ello se evaluó el efecto del azaspirácido 1 en células vivas control y en células tratadas con la toxina, así como en células control y tratadas que habían sido fijadas.

Efecto de los azaspirácidos sobre la estructura de la membrana celular

Para evaluar el efecto de los compuestos sobre la membrana celular las células control y las células tratadas con 50 nM AZA-1 fueron marcadas con un marcador específico de la membrana celular “CellMask Deep Red plasma membrane stain”. Tal como se muestra en la figura 20 no se observaron diferencias aparentes entre las células control y las células tratadas con 50 nM AZA-1. No obstante, en este caso es importante resaltar que estas imágenes han sido obtenidas después de tratar las células con la toxina durante 20 horas puesto que cuando se realizó la tinción en células incubadas con los compuestos durante tiempos más largos fue imposible teñir la membrana de las células vivas debido a que las células se despegaban del cubreobjetos durante el procedimiento de lavado.

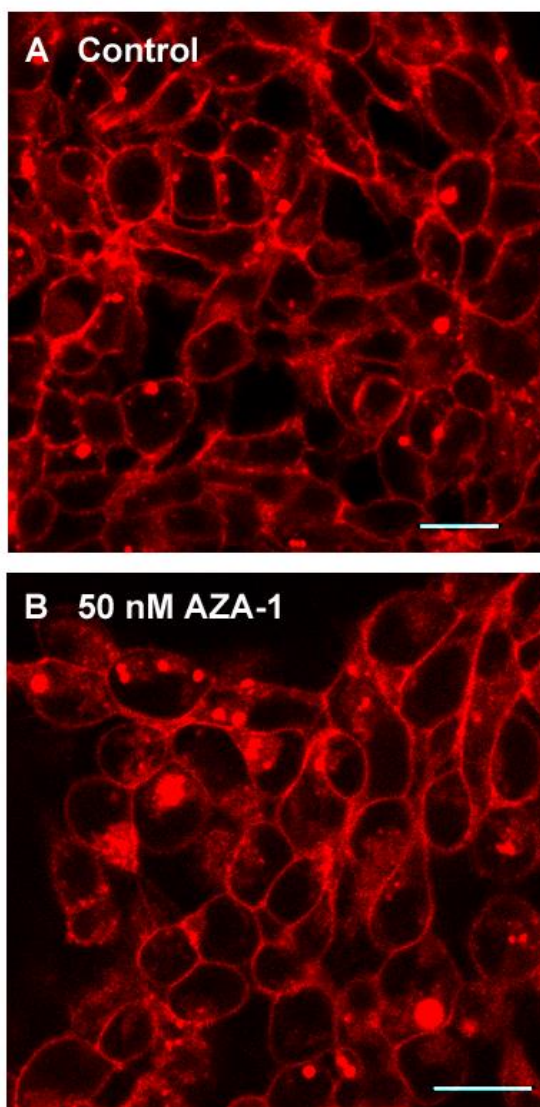


Figura 20. *Imágenes de microscopia confocal mostrando la tinción de la membrana celular en células control (A) y en células tratadas durante 20 horas con AZA-1 50 nM. La barra de escala es de 20 μ m.*

Efecto de los azaspirácidos sobre el citoesqueleto celular

Puesto que en los estudios iniciales para evaluar los efectos del AZA-1 sobre la morfología celular se observó que las células se despegaban de los cubreobjetos lo que impedía obtener resultados a partir de las 24 horas en cultivo, con el objeto de correlacionar los efectos citotóxicos con la morfología celular se realizaron tratamientos a 48 horas y se evaluó el efecto de los compuestos sobre el citoesqueleto empleando técnicas de inmunocitoquímica. En este caso se empleó un anticuerpo anti-actina puesto que los trabajos iniciales sobre el mecanismo de acción de los AZAs demostraron importantes cambios en el citoesqueleto en células de neuroblastoma humanas (Vilarino et al., 2006; Vilarino et al., 2007). En este caso, aunque se observó que las células se desprendían durante el procedimiento, las células restantes se observaron al microscopio confocal. Tal como se muestra en la figura 21, el tratamiento de las células HEK293 con diferentes concentraciones de azaspirácido durante 48 horas produjo un cambio progresivo en el citoesqueleto celular que fue dependiente de la concentración de toxina. Tal como se muestra en las imágenes de microscopia confocal las células control (figura 21A) y las células tratadas durante 48 horas con AZA-1 1 nM (figura 21B) mostraron una distribución normal de la actina mientras que en las células tratadas con 30 o 50 nM AZA-1 durante el mismo periodo (figura 21C y figura 21D, respectivamente) se observó una forma redondeada con pérdida de prolongaciones y una alteración obvia del citoesqueleto de actina. Estos resultados son similares a los obtenidos previamente en células de neuroblastoma humanas tratadas durante 48 horas con AZA-1 a las mismas concentraciones (Vilarino et al., 2006).

En un primer momento estos tratamientos se realizaron a 37 grados, temperatura a la cual también se realizaron los tratamientos para los ensayos de citotoxicidad. No obstante, es conveniente mencionar que cuando las células HEK293 se mantienen a 37 grados en lugar de a 30 grados la expresión de los canales de sodio dependientes de voltaje es menor (Burbidge et al., 2002; He and Soderlund, 2010).

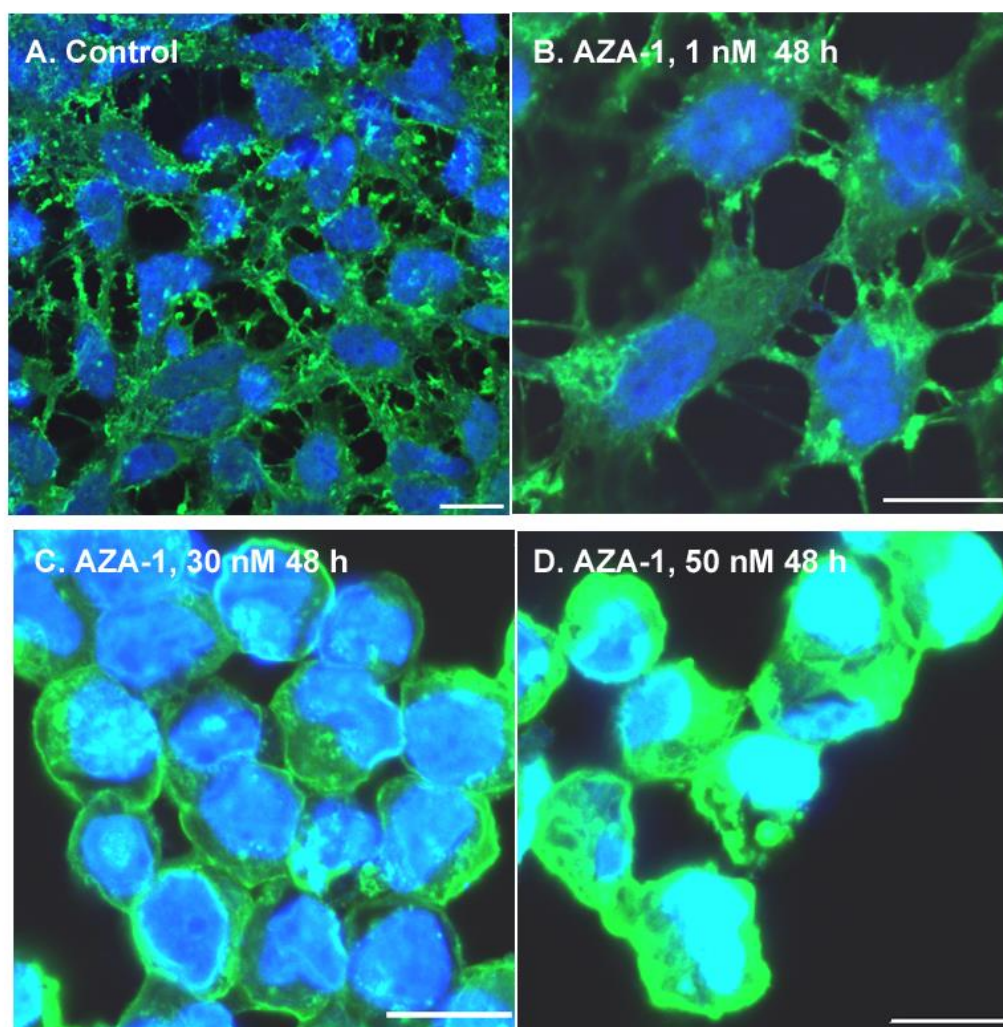


Figura 21. Imágenes de microscopía confocal que muestran la tinción del citoesqueleto de actina (verde) y del núcleo celular (azul) en células control y en las mismas células tratadas con AZA-1 a concentraciones de 1, 30 o 50 nM durante 48 horas en el medio de cultivo. En estos experimentos las células se mantuvieron a 37 °C durante todo el tratamiento. La barra de escala es de 20 μm .

Con el objetivo de evaluar la posible relación entre la expresión de los canales de sodio dependientes de voltaje y los efectos en el citoesqueleto producidos por los azaspirácidos, el mismo procedimiento se realizó en células tratadas durante 48 horas con las mismas concentraciones de AZAs pero que previamente al tratamiento se habían mantenido durante 34 horas a 30 grados centígrados para incrementar la expresión de los canales de sodio dependientes de voltaje (Burbidge et al., 2002; He and Soderlund, 2010). Una vez realizado el tratamiento las células se mantuvieron durante 48 horas a 30 grados centígrados.

Tal como se muestra en la figura 22, en estas condiciones, el efecto del AZA-1 sobre el citoesqueleto de actina fue similar al observado cuando el tratamiento se realizó a 30 °C. Es

decir, mientras que tanto las células control como las tratadas con 1 nM AZA-1 (figuras 22A y 22B, respectivamente) presentaban una distribución normal del citoesqueleto de actina, las células tratadas con 10, 30 y 50 nM AZA-1 (figuras 22C, 22D y 22E, respectivamente) presentaban una morfología redondeada y una evidente alteración del citoesqueleto de actina.

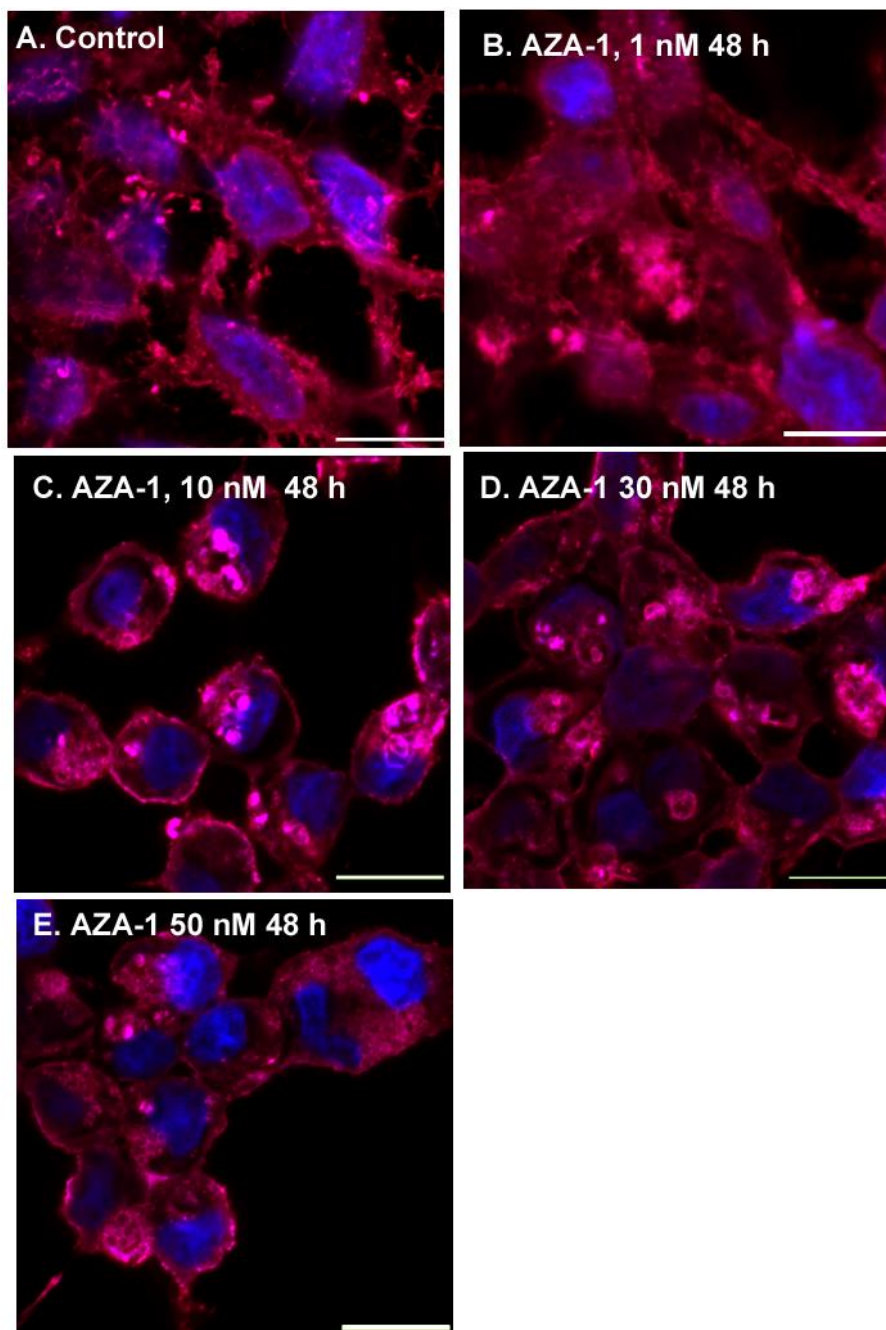


Figura 22. Imágenes de microscopia confocal que muestran la tinción del citoesqueleto de actina (rojo) y del núcleo celular (azul) en células control y en las mismas células tratadas con AZA-1 a concentraciones de 1, 10, 30 o 50 nM durante 48 horas en el medio de cultivo. La barra de escala es de 20 μm.

Discusión

Desde el descubrimiento del grupo de toxinas pertenecientes a la familia de los azaspirácidos (a finales de los años 90) se han identificado más de 60 análogos, si bien algunos de ellos son productos naturales y otros compuestos son resultado del metabolismo de los compuestos naturales por los mariscos o bien se generan por transformación de los análogos naturales durante la extracción de la toxina (Pelin et al., 2018). En la Unión Europea solamente están regulados los niveles de los azaspirácidos-1, -2 y -3 en productos pesqueros, puesto que estos compuestos representan los análogos más importantes por su toxicidad y su prevalencia. Los niveles máximos de estas toxinas en mariscos se han establecido teniendo en consideración su toxicidad intraperitoneal (EFSA, 2008, 2009). Recientemente se han descrito los factores de equivalencia tóxica (TEF, del inglés toxic equivalency factors) en ratones después de que los animales fueran alimentados con las toxinas (Pelin et al., 2018). Los autores evaluaron la toxicidad oral de estos compuestos después de tratamientos de 24 horas o 14 días y obtuvieron una dosis letal 50 (DL₅₀) de 443 µg/kg para el AZA-1 y 626 µg/kg para el AZA-2, lo que les llevó a establecer los TEFs de 1 para el AZA-1 y un TEF de 0.7 para AZA-2 (Pelin et al., 2018). Los TEFs son parámetros desarrollados para evaluar compuestos relacionados estructuralmente que comparten el mismo mecanismo de acción (Delistraty, 1997). Sin embargo, hay que tener en cuenta que para establecer la toxicidad real de estos compuestos se debería estudiar su farmacocinética e incluso considerar los TEFs obtenidos por métodos *in vivo* y métodos *in vitro* en aras de incrementar la consistencia de estos resultados. Por consiguiente, el hecho de que tanto el AZA-1 como el AZA-2 presentaran los mismos efectos *in vitro* tanto sobre la actividad metabólica como sobre el citoesqueleto celular sugiere que ambos compuestos podrían presentar diferentes propiedades farmacocinéticas o diferente estabilidad en el medio de cultivo, lo que explicaría las diferencias entre la toxicidad *in vivo* y la toxicidad *in vitro* (EFSA, 2008, 2009; Pelin et al., 2018) descrita en este trabajo.

En cuanto a los efectos *in vitro* de los azaspirácidos hay que remarcar que estos estudios han sido los más abundantes hasta el momento (Vilarino et al., 2006; Vale et al., 2007; Vilarino et al., 2007; Vale et al., 2010; Pelin et al., 2019), si bien los resultados obtenidos parecen diferir entre unos estudios y otros. Los estudios más recientes en células hepáticas no tumorales demostraron que estos compuestos no modificaban la viabilidad celular y aumentaban la actividad mitocondrial después de 24 horas de tratamiento (Pelin et al., 2019) cuando el efecto tóxico se evaluó empleando el ensayo del MTT y añadiendo 500 µg/µl de MTT durante 4 horas. En este caso, los autores asociaron el incremento en la actividad mitocondrial a alteraciones de la homeostasis y en los niveles intracelulares de iones Cl⁻ y K⁺. Por el contrario, estudios

iniciales demostraron toxicidad de estos compuestos en células neuronales (Vale et al., 2007; Vale et al., 2010), así como en células de neuroblastoma y en células tumorales de pulmón (Vilarino et al., 2006).

Es importante destacar que, aunque los azaspirácidos han sido identificados hace más de 20 años, su mecanismo de acción aún se desconoce. Estudios iniciales describieron la neurotoxicidad de los azaspirácidos en cultivos primarios de neuronas de ratón (Vale et al., 2007; Vale et al., 2010; Saifetiarova et al., 2017) así como la hiperpolarización de la membrana celular que se producía inmediatamente al añadir la toxina a las células (Vale et al., 2010; Amor et al., 2017) y el bloqueo de la despolarización producida en neuronas en presencia de altas concentraciones de potasio en el medio extracelular (Vale et al., 2010), si bien, este efecto se asoció inicialmente a cambios en el volumen celular (Vale et al., 2010). Además la neurotoxicidad de los azaspirácidos se redujo en presencia de inhibidores no específicos de los canales de cloro y al bloquear la sodio potasio ATPasa (Vale et al., 2010).

En este trabajo se ha demostrado una ligera reducción de la viabilidad celular cuando esta se analizaba empleando el ensayo del alamar blue, si bien no se observaron modificaciones en la actividad mitocondrial cuando se empleó el ensayo del MTT añadiendo este directamente en el medio de cultivo, tal como se demostró recientemente en células hepáticas (Pelin et al., 2019). Mientras que, por el contrario, cuando el ensayo MTT se realizó en tampón Locke's, tras varios lavados, se observó una intensa disminución en la viabilidad celular. Por consiguiente, los resultados obtenidos indican que el ensayo del MTT no es adecuado para evaluar la citotoxicidad de los compuestos que afecten al citoesqueleto o a la adherencia entre las células y la membrana extracelular puesto que la disminución en el número de células adherentes y el aspirado de las mismas, durante el lavado, puede conducir a resultados erróneos (Salomão et al., 2012). Es de destacar que las neuronas en cultivo primario requieren el tratamiento previo de las placas con matrices extracelulares tales como la poli-D-lisina para mejorar su adhesión a las superficies de plástico y vidrio (Vale et al., 2007) mientras que tanto las células de neuroblastoma como las células HEK293 se adhieren directamente a las superficies de plástico y vidrio (Burbidge et al., 2002; Vilarino et al., 2006), un aspecto que podría estar relacionado con los diferentes resultados obtenidos previamente en neuronas (Vale et al., 2007; Vale et al., 2010; Saifetiarova et al., 2017) y los obtenidos en este trabajo empleando el mismo protocolo para la realización del ensayo del MTT.

De acuerdo con esto, es importante mencionar que tanto en los trabajos previos en células de neuroblastoma (Vilarino et al., 2006; Vilarino et al., 2007; Vilarino, 2008) como en este trabajo se observaron importantes alteraciones en el citoesqueleto celular tras el tratamiento con azaspirácidos, si bien en neuronas el mayor efecto fue una disminución del volumen celular

(Vale et al., 2010). Por lo tanto, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que el efecto citotóxico de los azaspirácidos podría estar relacionado con los cambios en moléculas de adhesión. En este sentido, un artículo sometido para revisión ha demostrado que los azaspirácidos inhiben parcialmente los canales de sodio dependientes de voltaje en las células HEK293 que expresan la subunidad $\text{Na}_v1.7$ empleadas en este trabajo (Boente-Juncal et al., 2020). A este respecto, un artículo reciente ha descrito la relación entre la anquirina G, proteína que une las proteínas del citoesqueleto con las de la membrana plasmática con la pérdida de canales de sodio dependientes de voltaje (Saifetiarova et al., 2017). Además, el agrupamiento de los canales de sodio dependientes de voltaje en los nodos de Ranvier depende también de la proteína del citoesqueleto espectrina (Amor et al., 2017). Por lo tanto, podría existir una relación entre el efecto de los azaspirácidos sobre los canales de sodio dependientes de voltaje y los efectos de estas toxinas sobre el citoesqueleto. Esta hipótesis estaría de acuerdo con los resultados presentados en este trabajo que indican diferente efecto de los azaspirácidos sobre la viabilidad celular cuando el ensayo del MTT se realizó en el medio de cultivo o cuando el mismo ensayo se llevó a cabo tras lavar las células.

En resumen, los resultados presentados en este trabajo indican que los azaspirácidos modifican la actividad metabólica de las células y alteran la estructura del citoesqueleto celular. Si bien, aunque se ha descrito que estos compuestos inhiben parcialmente los canales de sodio dependientes de voltaje, este efecto podría ser indirecto puesto que los bloqueantes de canales de sodio no modificaron los efectos tóxicos de estos compuestos en células HEK293 $\text{Na}_v1.7$. Por consiguiente, se necesitan estudios adicionales para elucidar la interacción entre los azaspirácidos, la actividad metabólica y el citoesqueleto celular.

Conclusiones

En función de los resultados obtenidos en este trabajo se pueden obtener las siguientes conclusiones:

1. El ensayo del MTT no es adecuado para evaluar la citotoxicidad de compuestos que afecten al citoesqueleto celular puesto que ofrece resultados diferentes en función del protocolo empleado.
2. Los canales de sodio dependientes de voltaje no están directamente implicados en la disminución de la adhesión celular producida por los azaspirácidos.
3. El AZA-1 disminuye la actividad metabólica en células HEK293 Na_v1.7.
4. El AZA-1 altera el citoesqueleto celular de forma dependiente de la concentración.
5. La interacción entre los azaspirácidos y los canales sodio dependientes de voltaje podría estar relacionada con la influencia de la actina sobre la activación o inactivación de canales iónicos.

Bibliografía

- Amor V, Zhang C, Vainshtein A, Zhang A, Zollinger DR, Eshed-Eisenbach Y, Brophy PJ, Rasband MN, Peles E (2017) The paranodal cytoskeleton clusters Na(+) channels at nodes of Ranvier. *Elife* 6.
- Bechard A (2019) Red tide at morning, tourists take warning? County-level economic effects of HABS on tourism dependent sectors. *Harmful Algae* 85:101689.
- Biessy L, Smith KF, Harwood DT, Boundy MJ, Hawes I, Wood SA (2019) Spatial variability and depuration of tetrodotoxin in the bivalve *Paphies australis* from New Zealand. *Toxicon* X 2:100008.
- Boente-Juncal A, Raposo-García S, Costas C, Louzao M, Vale C, Botana L (2020) Partial blockade of human voltage-dependent sodium channels by the marine toxins azaspiracids. *Chem Res Toxicol* (resubmitido para revisión).
- Boente-Juncal A, Alvarez M, Antelo A, Rodriguez I, Calabro K, Vale C, Thomas OP, Botana LM (2019) Structure Elucidation and Biological Evaluation of Maitotoxin-3, a Homologue of Gambierone, from *Gambierdiscus belizeanus*. *Toxins* (Basel) 11.
- Botana LM (2016) Toxicological Perspective on Climate Change: Aquatic Toxins. *Chem Res Toxicol* 29:619-625.
- Botana LM, Vilariño N (2018) Una vision de las toxinas marinas en el horizonte del año 2050 desde la perspectiva del cambio climático, la bioseguridad y la seguridad alimentaria. In: (Farmacología Dd, ed), pp 732-749: Instituto Español de Estudios Estratégicos Boletín IEEE.
- Botana LM, Alfonso A, Rodriguez I, Botana AM, Louzao Mdel C, Vieytes MR (2016) How Safe Is Safe for Marine Toxins Monitoring? *Toxins* (Basel) 8.
- Botana LM, Vieytes, M. R., Alfonso, A. and Louzao, M. C. (1996) Phycotoxins: paralytic shellfish poisoning and diarrhetic shellfish poisoning. In: Handbook of food analysis. Residues and other food component analysis (L.M.L N, ed), pp 1147-1169. New York: Marcel Dekker.
- Burbidge SA, Dale TJ, Powell AJ, Whitaker WR, Xie XM, Romanos MA, Clare JJ (2002) Molecular cloning, distribution and functional analysis of the NA(V)1.6. Voltage-gated sodium channel from human brain. *Brain Res Mol Brain Res* 103:80-90.
- Chevallier OP, Graham SF, Alonso E, Duffy C, Silke J, Campbell K, Botana LM, Elliott CT (2015) New insights into the causes of human illness due to consumption of azaspiracid contaminated shellfish. *Sci Rep* 5.
- Delistraty D (1997) Toxic equivalency factor approach for risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicological & Environmental Chemistry* 64:81-108.

- Dhanji-Rapkova M, O'Neill A, Maskrey BH, Coates L, Swan SC, Teixeira Alves M, Kelly RJ, Hatfield RG, Rowland-Pilgrim SJ, Lewis AM, Turner AD (2019) Variability and profiles of lipophilic toxins in bivalves from Great Britain during five and a half years of monitoring: azaspiracids and yessotoxins. *Harmful Algae* 87:2.
- EFSA (2008) Marine biotoxins in shellfish - Azaspiracid group. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain. *The EFSA Journal* 723:1-52.
- EFSA (2009) Influence of processing on the levels of lipophilic marine biotoxins in bivalve molluscs. *EFSA Journal* 7:1016.
- Estevez P, Castro D, Pequeño-Valtierra A, Giraldez J, Gago-Martinez A (2019) Emerging Marine Biotoxins in Seafood from European Coasts: Incidence and Analytical Challenges. *Foods (Basel, Switzerland)* 8:149.
- Farabegoli F, Blanco L, Rodríguez LP, Vieites JM, Cabado AG (2018) Phycotoxins in Marine Shellfish: Origin, Occurrence and Effects on Humans. *Marine Drugs* 16:188.
- Fauquier DA, Flewelling LJ, Maucher JM, Keller M, Kinsel MJ, Johnson CK, Henry M, Gannon JG, Ramsdell JS, Landsberg JH (2013) Brevetoxicosis in seabirds naturally exposed to *Karenia brevis* blooms along the central west coast of Florida. *J Wildl Dis* 49:246-260.
- FDA (2012) Food and Drug Administration. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins. *Bad Bug Book* p 272.
- Ganot N, Meker S, Reytman L, Tzuber A, Tshuva EY (2013) Anticancer metal complexes: synthesis and cytotoxicity evaluation by the MTT assay. *J Vis Exp*:e50767.
- He B, Soderlund DM (2010) Human embryonic kidney (HEK293) cells express endogenous voltage-gated sodium currents and Nav 1.7 sodium channels. *Neurosci Lett* 469:268-272.
- Janmey PA (1998) The cytoskeleton and cell signaling: component localization and mechanical coupling. *Physiol Rev* 78:763-781.
- Jauffrais T, Kilcoyne J, Herrenknecht C, Truquet P, Sechet V, Miles CO, Hess P (2013) Dissolved azaspiracids are absorbed and metabolized by blue mussels (*Mytilus edulis*). *Toxicon* 65:81-89.
- Jauffrais T, Herrenknecht C, Sechet V, Sibat M, Tillmann U, Krock B, Kilcoyne J, Miles CO, McCarron P, Amzil Z, Hess P (2012) Quantitative analysis of azaspiracids in *Azadinium spinosum* cultures. *Anal Bioanal Chem* 403:833-846.
- Khor Goot Heah NRBMS, Nurul Ain Bt Khoruddin, Syairah Nabila Bt Suhaimi, Yusmiaidil Putera B. Mohd Yusof and Tang Thean Hock (2017) A Review on Di Methyl Thiazoldiphenyl-Tetrazoliumbromide (MTT) Assay in Cell Viability. *Research Journal of Applied Sciences* 12:372-378.

- Kilcoyne J, Nulty C, Jauffrais T, McCarron P, Herve F, Foley B, Rise F, Crain S, Wilkins AL, Twiner MJ, Hess P, Miles CO (2014) Isolation, Structure Elucidation, Relative LC-MS Response, and in Vitro Toxicity of Azaspiracids from the Dinoflagellate *Azadinium spinosum*. *Journal of Natural Products* 77:2465-2474.
- Kim JH, Tillmann U, Adams NG, Krock B, Stutts WL, Deeds JR, Han MS, Trainer VL (2017) Identification of *Azadinium* species and a new azaspiracid from *Azadinium poporum* in Puget Sound, Washington State, USA. *Harmful Algae* 68:152-167.
- Krock B, Tillmann U, Tebben J, Trefault N, Gu H (2019) Two novel azaspiracids from *Azadinium poporum*, and a comprehensive compilation of azaspiracids produced by *Amphidomataceae*, (Dinophyceae). *Harmful Algae* 82:1-8.
- Krock B, Tillmann U, Voss D, Koch BP, Salas R, Witt M, Potvin E, Jeong HJ (2012) New azaspiracids in *Amphidomataceae* (Dinophyceae). *Toxicon* 60:830-839.
- Lefebvre KA, Quakenbush L, Frame E, Huntington KB, Sheffield G, Stimmelmayer R, Bryan A, Kendrick P, Ziel H, Goldstein T, Snyder JA, Gelatt T, Gulland F, Dickerson B, Gill V (2016) Prevalence of algal toxins in Alaskan marine mammals foraging in a changing arctic and subarctic environment. *Harmful Algae* 55:13-24.
- Liebeskind BJ, Hillis DM, Zakon HH (2011) Evolution of sodium channels predates the origin of nervous systems in animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108:9154-9159.
- McCarron P, Kilcoyne J, Miles CO, Hess P (2009) Formation of Azaspiracids-3, -4, -6, and -9 via decarboxylation of carboxyazaspiracid metabolites from shellfish. *J Agric Food Chem* 57:160-169.
- McKibben SM, Peterson W, Wood AM, Trainer VL, Hunter M, White AE (2017) Climatic regulation of the neurotoxin domoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:239-244.
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55-63.
- Ofuji K, Satake M, McMahon T, Silke J, James KJ, Naoki H, Oshima Y, Yasumoto T (1999) Two analogs of azaspiracid isolated from mussels, *Mytilus edulis*, involved in human intoxication in Ireland. *Nat Toxins* 7:99-102.
- Pelin M, Kilcoyne J, Florio C, Hess P, Tubaro A, Sosa S (2019) Azaspiracids Increase Mitochondrial Dehydrogenases Activity in Hepatocytes: Involvement of Potassium and Chloride Ions. *Mar Drugs* 17.
- Pelin M, Kilcoyne J, Nulty C, Crain S, Hess P, Tubaro A, Sosa S (2018) Toxic equivalency factors (TEFs) after acute oral exposure of azaspiracid 1, -2 and -3 in mice. *Toxicol Lett* 282:136-146.

- Percopo I, Siano R, Rossi R, Soprano V, Sarno D, Zingone A (2013) A new potentially toxic *Azadinium* species (Dinophyceae) from the Mediterranean Sea, *A. dexteroporum* sp. nov. *J Phycol* 49:950-966.
- Pistocchi R, Guerrini F, Pezzolesi L, Riccardi M, Vanucci S, Ciminiello P, Dell'Aversano C, Forino M, Fattorusso E, Tartaglione L, Milandri A, Pompei M, Cangini M, Pigozzi S, Riccardi E (2012) Toxin levels and profiles in microalgae from the north-Western Adriatic Sea--15 years of studies on cultured species. *Mar Drugs* 10:140-162.
- Rampersad SN (2012) Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors (Basel)* 12:12347-12360.
- Rehmann N, Hess P, Quilliam MA (2008) Discovery of new analogs of the marine biotoxin azaspiracid in blue mussels (*Mytilus edulis*) by ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 22:549-558.
- Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, Minor L (2004) Cell Viability Assays. In: *Assay Guidance Manual* (Sittampalam GS, Grossman A, Brimacombe K, Arkin M, Auld D, Austin CP, Baell J, Bejcek B, Caaveiro JMM, Chung TDY, Coussens NP, Dahlin JL, Devanaryan V, Foley TL, Glicksman M, Hall MD, Haas JV, Hoare SRJ, Inglese J, Iversen PW, Kahl SD, Kales SC, Kirshner S, Lal-Nag M, Li Z, McGee J, McManus O, Riss T, Saradjian P, Trask OJ, Jr., Weidner JR, Wildey MJ, Xia M, Xu X, eds). Bethesda (MD).
- Rossi R, Dell'Aversano C, Krock B, Ciminiello P, Percopo I, Tillmann U, Soprano V, Zingone A (2017) Mediterranean *Azadinium dexteroporum* (Dinophyceae) produces six novel azaspiracids and azaspiracid-35: a structural study by a multi-platform mass spectrometry approach. *Anal Bioanal Chem* 409:1121-1134.
- Saifetiarova J, Taylor AM, Bhat MA (2017) Early and Late Loss of the Cytoskeletal Scaffolding Protein, Ankyrin G Reveals Its Role in Maturation and Maintenance of Nodes of Ranvier in Myelinated Axons. *J Neurosci* 37:2524-2538.
- Salomão P, Al-Ahji LP, Gasque K, Oliveira R, Magalhaes AC (2012) Comparison among different MTT assay protocols in NIH3T3 fibroblasts.
- Satake M, Ofuji K, Naoki H, James KJ, Furey A, McMahon T, Silke J, Yasumoto T (1998) Azaspiracid, a New Marine Toxin Having Unique Spiro Ring Assemblies, Isolated from Irish Mussels, *Mytilus edulis*. *Journal of the American Chemical Society* 120:9967-9968.
- Schwiebert EM, Mills JW, Stanton BA (1994) Actin-based cytoskeleton regulates a chloride channel and cell volume in a renal cortical collecting duct cell line. *J Biol Chem* 269:7081-7089.

- Shaw JE, Koleske AJ (2020) Functional interactions of ion channels with the actin cytoskeleton: does coupling to dynamic actin regulate NMDA receptors? *The Journal of Physiology*.
- Shumilina EV, Negulyaev YA, Morachevskaya EA, Hinssen H, Khaitlina SY (2003) Regulation of sodium channel activity by capping of actin filaments. *Mol Biol Cell* 14:1709-1716.
- Tillmann U, Elbrächter, M., Krock, B., John, U. and AllanCembella (2009) *Azadinium spinosum* gen. et sp. nov. (Dinophyceae) identified as a primary producer of azaspiracid toxins. *European Journal of Phycology* 44:63-79.
- Trainer VL, Moore SK, Hallegraeff G, Kudela RM, Clement A, Mardones JJ, Cochlan WP (2020) Pelagic harmful algal blooms and climate change: Lessons from nature's experiments with extremes. *Harmful Algae* 91:101591.
- Twiner MJ, Rehmann N, Hess P, Doucette GJ (2008) Azaspiracid shellfish poisoning: a review on the chemistry, ecology, and toxicology with an emphasis on human health impacts. *Mar Drugs* 6:39-72.
- Unión Europea U Reglamento nº 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal. *Diario Oficial de la Unión Europea*, nº L 139:7.
- Unión Europea U (2011) Commission Regulation (EU) No 15/2011 of 10 January 2011 amending Regulation (EC) No 2074/2005 as regards recognised testing methods for detecting marine biotoxins in live bivalve molluscs. In, p L6/3. COMMISSION REGULATION (EU) No 15/2011, of 10 January 2011.
- Vale C, Nicolaou KC, Frederick MO, Vieytes MR, Botana LM (2010) Cell volume decrease as a link between azaspiracid-induced cytotoxicity and c-Jun-N-terminal kinase activation in cultured neurons. *Toxicol Sci* 113:158-168.
- Vale C, Nicolaou KC, Frederick MO, Gomez-Limia B, Alfonso A, Vieytes MR, Botana LM (2007) Effects of azaspiracid-1, a potent cytotoxic agent, on primary neuronal cultures. A structure-activity relationship study. *J Med Chem* 50:356-363.
- Van Egmond H, Van Apeldoorn M, Speijers G, Egmond H, Apeldoorn M (2005) Biotoxinas Marinas: Estudio FAO: alimentación y nutrición.
- Vilarino N (2008) Marine toxins and the cytoskeleton: azaspiracids. *Febs J* 275:6075-6081.
- Vilarino N, Nicolaou KC, Frederick MO, Vieytes MR, Botana LM (2007) Irreversible cytoskeletal disarrangement is independent of caspase activation during in vitro azaspiracid toxicity in human neuroblastoma cells. *Biochem Pharmacol* 74:327-335.
- Vilarino N, Nicolaou KC, Frederick MO, Cagide E, Ares IR, Louzao MC, Vieytes MR, Botana LM (2006) Cell growth inhibition and actin cytoskeleton disorganization induced by azaspiracid-1 structure-activity studies. *Chem Res Toxicol* 19:1459-1466.

- Wisedchaisri G, Tonggu L, McCord E, El-Din TMG, Wang L, Zheng N, Catterall WA (2019) Resting-State structure and gating mechanism of a Voltage-Gated sodium channel. *Cell* 178:993-1003. e1012.
- Zhao F, Li X, Jin L, Zhang F, Inoue M, Yu B, Cao Z (2016) Development of a Rapid Throughput Assay for Identification of hNav1.7 Antagonist Using Unique Efficacious Sodium Channel Agonist, Antillatoxin. *Mar Drugs* 14.